

UNIVERSITÉ PARIS VII

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE
DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par
FRANÇOIS LAVELLE

Sujet : *Contribution à l'étude des propriétés structurales,
cinétiques et biologiques des Superoxyde Dismu-
tases.*

Soutenue le octobre 1974 devant la Commission
d'examen :

M. F. CHAPEVILLE, président.
M. M. LAZDUNSKI
M. G. CONTESSE
Mme F. LABEYRIE
M. A.-M. MICHELSON, examinateurs.

PARIS 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE
DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

UNIVERSITÉ PARIS VII

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE
DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par
FRANÇOIS LAVELLE

Sujet : *Contribution à l'étude des propriétés structurales,
cinétiques et biologiques des Superoxyde Dismu-
tases.*

Soutenue le octobre 1974 devant la Commission
d'examen :

M. F. CHAPEVILLE, président.
M. M. LAZDUNSKI
M. G. CONTESSE
Mme F. LABEYRIE
M. A.-M. MICHELSON, examinateurs.

PARIS 1974



**POUR MARIE-SUZANNE,
GUILLAUME ET MATHIEU.**

Je veux tout d'abord exprimer ma reconnaissance au Comité de « Biologie moléculaire » de la Délégation générale à la Recherche scientifique et technique qui m'a permis de m'orienter vers cette discipline, alors toute nouvelle pour moi.

Les recherches dont cette thèse est l'aboutissement, ont été effectuées dans le Service de biochimie-physique de l'Institut de Biologie physico-chimique : je remercie très sincèrement Monsieur A.-M. MICHELSON de la confiance qu'il m'a témoignée ; ma formation de chercheur doit beaucoup à sa vaste culture scientifique et à sa disponibilité constante.

Je prie Monsieur le professeur F. CHAPEVILLE, Monsieur le professeur M. LAZDUNSKI, Monsieur G. CONTESSE, maître de conférences à l'Université de Paris VII, Madame F. LABEYRIE, directeur de recherches au C.N.R.S., qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, de trouver ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

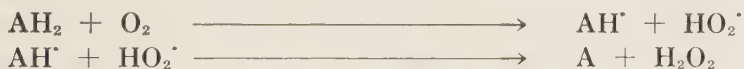
Je remercie très chaleureusement Monsieur J.-P. HENRY, dont les suggestions et amicales critiques ont été très précieuses. Ces recherches ont été l'objet de collaborations avec diverses personnes dont je garde le meilleur souvenir : Monsieur le professeur E. MARTIN FIELDEN et Monsieur P. ROBERTS pour les précieuses expériences de radiolyse par électrons accélérés ; Madame K. PUGET pour certaines expériences biologiques ; Monsieur P. DUROSAY pour son aide technique compétente.

PLAN

INTRODUCTION	15
MATERIELS ET METHODES	33
RESULTATS	
Chap. I. — Purification des Superoxyde dismutases	51
Chap. II. — Propriétés structurales et enzymatiques	65
Chap. III. — Propriétés cinétiques	93
Chap. IV. — Propriétés biologiques	103
CONCLUSIONS GENERALES	113
BIBLIOGRAPHIE	119

INTRODUCTION

La molécule d'oxygène dans son état fondamental possède deux électrons non appariés qui rendent compte des propriétés paramagnétiques de cette molécule. L'addition directe d'un doublet électronique étant soumise à une restriction de spin, on doit admettre que les réactions d'oxydation impliquant l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons doivent procéder par étapes monoélectroniques selon le schéma (1) :



L'implication du radical $\text{HO}_2^\cdot$ et de sa base conjuguée l'ion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ dans les réactions biologiques ainsi que l'existence d'un système de défense des cellules aérobies contre la toxicité de ce radical ont été postulées. Nous allons examiner les travaux qui ont contribué à démontrer la participation de l'ion superoxyde dans quelques systèmes biochimiques et à découvrir et étudier les superoxyde dismutases (SOD) qui catalysent la dismutation de ces radicaux selon la réaction :

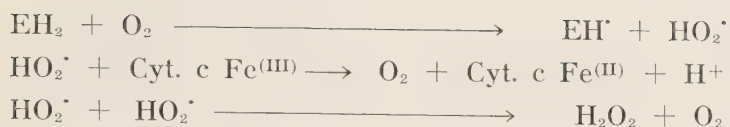


I — CARACTERISATION DE L'ION SUPEROXYDE O_2^- ET DECOUVERTE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE

En 1957, Fridovich a observé que la xanthine oxydase qui catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique pouvait provoquer, sans diminution de son activité enzymatique propre, l'autooxydation des sulfites qui est une réaction radicalaire en chaîne bien connue (2) (3) ; l'eau oxygénée, qui par ailleurs est un des produits finaux de la réaction, se révélant inopérante pour conduire à ce type de réaction dépendant de la concentration en oxygène, Fridovich a proposé en 1960 l'ion superoxyde O_2^- comme étant l'agent responsable de cette réaction secondaire (4) ; à l'appui de cette proposition, l'auteur a notamment démontré que l'oxydation des sulfites peut être provoquée électrochimiquement dans des conditions où il y a réduction cathodique de l'oxygène en ion superoxyde (5). D'autres réactions provoquées par le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase/oxygène ont été décrites, notamment la réduction du ferricytochrome c (6) (7) (8) et la chimiluminescence du luminol (9).

McCord et Fridovich ont proposé un modèle d'action du système enzymatique expliquant la formation d'ion superoxyde disponible pour initier les réactions précédentes (10) :





En 1968, une étape décisive dans la compréhension de ces phénomènes a été accomplie par McCord et Fridovich lorsqu'ils ont découvert une enzyme la superoxyde dismutase (SOD) capable de catalyser la réaction de dismutation de l'ion superoxyde (10) :



Ils ont, en effet, observé que des préparations d'anhydrase carbonique humaine et de myoglobine de cœur de cheval inhibaient la réduction du ferricytochrome c ou l'oxydation des sulfites, en consommant par la réaction de dismutation précédente des ions superoxyde et ceci, sans altérer les propriétés cinétiques de la xanthine oxydase ; poursuivant leurs recherches, ils ont pu montrer par chromatographie sur DEAE-cellulose que cette activité superoxyde dismutase était assurée par une protéine distincte de l'anhydrase carbonique et de la myoglobine. McCord et Fridovich ont purifié cette enzyme à partir du sang de bœuf et ont montré que la superoxyde dismutase obtenue était identique à une métalloprotéine à cuivre, isolée depuis longtemps à partir de sang de mammifères, appelée érythrocupréine, et d'activité enzymatique évidemment inconnue (11). Cette enzyme allait se révéler particulièrement précieuse pour déceler la participation insoupçonnée d' $\text{O}_2^{\bullet -}$ dans de nombreuses réactions chimiques et biochimiques.

II - REACTIONS ET MECANISMES IMPLIQUANT L'ION SUPEROXYDE $O_2^{\cdot-}$

Une réaction dans laquelle l'ion superoxyde est un intermédiaire réactionnel pourra être inhibée par la superoxyde dismutase dans la mesure où $O_2^{\cdot-}$ sera évidemment accessible à l'enzyme ; par contre les systèmes produisant de l'ion superoxyde en fin de réaction ne seront pas modifiés par la superoxyde dismutase, mais pourront donner lieu à des réactions secondaires, telle l'oxydation des sulfites, qui seront inhibées par l'addition de superoxyde dismutase.

1. - SYSTÈMES CONDUISANT A LA PRODUCTION D'ION SUPEROXYDE.

Quelques systèmes enzymatiques libérant de l'ion superoxyde en fin de réaction sont connus : outre la xanthine oxydase, l'ion superoxyde peut être produit par d'autres flavoprotéines comme l'aldéhyde oxydase de foie de lapin (12) et la diamine oxydase de rein de porc (13). Cette capacité est liée à la présence du groupement prosthétique flavinique puisque l'ion superoxyde a été mis en évidence lors de l'oxydation des flavines réduites : Massey et Balou ont identifié par la technique de congélation rapide couplée à la résonance paramagnétique électronique le radical $O_2^{\cdot-}$ (14) (15) ; Michelson a mis en évidence une réaction concomittante de chimiluminescence du luminol inhibée par la superoxyde dismutase (16). L'ion superoxyde a été mis en évidence dans d'autres systèmes biochimiques comme la réoxydation de la ferrédoxine d'épinards réduite enzymatiquement par la TPN^+ ferrédoxine oxydoréductase (17) et comme la réaction d'autooxydation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine (18).

$O_2^{\cdot -}$ est une espèce libérée dans certains processus physico-chimiques tels que la réduction électrochimique de l'oxygène, l'ultrasonication et la photolyse par éclairs UV de solutions aqueuses aérées (19) (20) (21) (22). La formation de radicaux $O_2^{\cdot -}$ avait été suggérée par Weiss dans certains systèmes minéraux hydroxylants tels que le mélange Fe^{++}/O_2 /ligand (ions phosphate ou EDTA) dont la réaction primaire peut s'écrire :



le ligand déplaçant l'équilibre en faveur de la réaction directe (23) (24) ; ce réactif ainsi que d'autres complexes métalliques de nickel et cobalt peuvent engendrer des réactions de chimiluminescence du luminol où l'ion superoxyde a été identifié (16) (25).

2. - SYSTÈMES IMPLIQUANT LA PARTICIPATION RÉACTIONNELLE D'ION SUPEROXYDE.

$O_2^{\cdot -}$ a pu être caractérisé comme entité réactionnelle dans plusieurs réactions chimiques et biochimiques. L'autooxydation de l'adrénaline en adrénochrome qui se produit très rapidement en solution à pH basique est supprimée par addition de superoxyde dismutase : ce processus étant vraisemblablement provoqué par des traces métalliques présentes dans les solutions et pouvant réduire l'oxygène (26). La biogénèse de l'éthylène, hormone végétale du murissement, à partir de son précurseur le méthional est un processus dépendant d' $O_2^{\cdot -}$: l'incubation du méthional avec un donneur d' $O_2^{\cdot -}$ libère de l'éthylène dont la production est supprimée par la superoxyde dismutase (27). Feigelson et ses collaborateurs ont montré qu' $O_2^{\cdot -}$ était impliqué dans le mécanisme d'activation de la 2, 3 tryptophane dioxygénase, enzyme catalysant l'oxydation du tryp-

tophane en formylkynurénine par ouverture du noyau pyrrole ; cette enzyme contient 2 atomes de fer hématinique et 2 atomes de cuivre dont l'état fonctionnel doit être Cu^+ ; en présence de substrat, la réaction enzymatique démarre après un temps de latence qui peut être raccourci par addition de certains réducteurs ; ce temps de latence est maintenu si on ajoute simultanément une aliquote de superoxyde dismutase ; ces réducteurs peuvent réduire l'oxygène en ion superoxyde qui réagit ensuite séquentiellement avec le cuivre de l'enzyme pour donner l'ion cuivreux actif (28). Un autre système impliquant l'ion superoxyde est le système de bioluminescence de la Pholade dactyle étudié par Henry, Isambert et Michelson (29) (30) (31) (32). Ce système met en jeu une enzyme la luciférase et un substrat la luciférine qui présente la particularité d'être une protéine (P.M. 40 000) ; l'oxydation de la luciférine par la luciférase donne une émission bleu vert ; la lumière peut être obtenue en absence de luciférase, par action sur la seule luciférine de différents réactifs : injection d'ions ferreux en tampon phosphate, incubation avec le système xanthine/xanthine oxydase/oxygène ; comme nous l'avons vu précédemment, ces systèmes sont des producteurs potentiels d'ions superoxyde et effectivement la superoxyde dismutase inhibe ces réactions lumineuses ; de même, la réaction enzymatique luciférine-luciférase-oxygène peut être directement inhibée par la superoxyde dismutase à pH 9 (33).

III — *LES SUPEROXYDE DISMUTASES*

Nous avons déjà décrit comment l'activité superoxyde dismutase de l'érythrocypréine a été mise en évidence dans le sang de bœuf (11). En 1970, Keele a purifié une super-

oxyde dismutase chez *E. coli* : il s'agit cette fois d'une métalloprotéine contenant du manganèse (34). Au cours de notre propre travail, les superoxyde dismutases de sources diverses ont été purifiées : chez les cellules Eucaryotes, les enzymes de *Neurospora crassa*, de germe de blé, de foie de poussin, de petits pois, de *Saccharomyces cerevisiae* étaient successivement isolées et contenaient toutes du cuivre comme métal fonctionnel (35) (36) (37) (38) (39) ; chez les bactéries, une enzyme à manganèse était isolée chez *Streptococcus mutans* (40) tandis qu'une nouvelle classe de superoxyde dismutases contenant du fer comme métal fonctionnel était découverte chez les bactéries lumineuses marines *Photobacterium leiognathi* et *Photobacterium cepia* par Puget, Michelson et Halbwachs (41) (42) ; une iso-enzyme à fer était également mise en évidence chez *E. coli* (43).

1. - PROPRIÉTÉS STRUCTURALES.

A. Enzymes à cuivre.

a) Purification et poids moléculaire.

Les différentes enzymes à cuivre présentent des propriétés structurales très voisines des érythrocupréines bovine ou humaine isolées et étudiées par plusieurs équipes (11) (14) (15) (16) (47) (48). La purification de l'érythrocupréine passe par une étape très particulière suggérant une distribution exceptionnelle des groupements hydrophobes de l'enzyme : après une lyse des érythrocytes dans l'eau, un mélange chloroforme-éthanol est ajouté pour précipiter l'hémoglobine ; après centrifugation, le surnageant est additionné de phosphate disodique jusqu'à l'obtention d'une séparation de phase ; la superoxyde dismutase est intégralement présente dans la phase organique supérieure et

peut être précipitée sans dénaturation par addition d'acétone. Les poids moléculaires des érythrocupréines humaine et bovine ont été estimés à 33 000 et 32 600 ; l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS a montré que ces enzymes sont constituées de deux subunités de taille égale (16 300 érythrocupréine bovine ; 16 000 érythrocupréine humaine).

b) *Propriétés optiques et métalloprotéiques.*

Les enzymes exhibent dans l'ultraviolet une absorption inhabituelle due à l'absence de tryptophane ($\epsilon_{258} = 10\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ érythrocupréine bovine ; $\epsilon_{265} = 18\,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ érythrocupréine humaine) et présentent en solutions concentrées une coloration bleue. Le spectre visible présente en effet une transition large centrée vers 680 nm ($\epsilon_{680} = 300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ érythrocupréine bovine). Les mesures d'absorption atomique démontrent la présence de deux atomes de cuivre par molécule d'enzyme ; Caricco et Deutsch ont trouvé également l'existence de deux atomes de zinc dans la molécule (49). Les rôles respectifs du cuivre et du zinc sont distincts : par dialyse contre un tampon acétate pH 3,8 contenant de l'EDTA, une apoenzyme inactive sans cuivre ni zinc peut être obtenue ; l'incubation à pH neutre de l'apoenzyme avec des ions cuivriques restaure quantitativement l'activité (11) ; on attribue au zinc un rôle stabilisateur de la structure protéique ; en effet l'enzyme reconstituée en la seule présence d'ions Cu^{++} présente une stabilité thermique plus faible que l'holoenzyme native et l'addition d'ions Zn^{++} permet de retrouver la stabilité thermique originelle (50) ; les ions cyanure spécifiques du cuivre sont d'autre part de puissants inhibiteurs de l'activité superoxyde dismutase. L'érythrocupréine donne un spectre R.P.E. caractéristique du cuivre cuivrique et la structure hyperfine de ce signal suggère la participation d'atomes d'azote comme ligands du

métal (51) ; cette donnée a été vérifiée par Forman qui a mis en évidence la participation de 3,6 résidus histidine par site cuivrique : l'holoenzyme est complètement résistante à la réaction de photosensibilisation par le bleu de méthylène, spécifique des noyaux imidazole, alors que dans l'apoenzyme, 3,6 résidus histidine par monomère sont photosensibles, et qu'après cette réaction il est impossible de reconstituer l'enzyme native (52).

c) *Propriétés diverses.*

Weisiger a constaté des phénomènes d'association par ponts disulfure intermoléculaires pour l'enzyme cytoplasmique de foie de poussin : l'enzyme fraîchement isolée présente une coloration bleue et un poids moléculaire de 30 600 ; après quelques jours de stockage au froid, l'enzyme tout en retenant intégralement son activité devient progressivement incolore et des espèces de poids moléculaire 32 000, 48 000, 72 000 peuvent être mises en évidence ; tandis que l'enzyme fraîchement isolée possède 1,2 groupement SH titrable par subunité et présente intégralement son cuivre à l'état cuivrique, les solutions anciennes ne sont plus réactives au parachloromercureibenzoate et sont cuivreuses ; ces données s'interprètent par un processus d'autoréduction du cuivre cuivrique par les groupements SH qui deviennent alors disponibles pour former des ponts disulfure intermoléculaires ; ce processus est rapidement et intégralement réversible par action du mercaptoéthanol (37). L'existence d'isoenzymes à cuivre a été montrée dans le germe de blé où deux superoxyde dismutases de poids moléculaire identique et électrophorétiquement distinctes ont pu être isolées (36).

B. *Enzymes à manganèse.*

Chez *E. coli*, la superoxyde dismutase est une protéine de poids moléculaire 39 500, constituée de 2 subunités de

taille identique. L'enzyme possède un spectre ultraviolet classique ; les solutions concentrées d'enzyme sont roses et le spectre visible est caractérisé par une transition centrée vers 430 nm ($\epsilon = 400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Par absorption atomique, on a pu démontrer la présence de 1 atome de manganèse par molécule d'enzyme, les autres métaux notamment le cuivre, le fer, le zinc étant présents à l'état de traces (34). Alors que l'érythrocupréine est résistante à l'action du mélange chloroforme-éthanol, mais est inhibée par les ions cyanure, l'enzyme bactérienne est dénaturée par ce traitement organique, mais conserve son activité en présence d'ions cyanure. Durant la rédaction de ce travail, une autre superoxyde dismutase à manganèse mais de poids moléculaire plus élevé a été mise en évidence dans les mitochondries de foie de poussin : le poids moléculaire est de 80 000, quatre chaînes polypeptidiques (20 000) sont caractérisées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en SDS ; 2, 3 atomes de manganèse par tétramère sont détectés en absorption atomique (37). Notons également qu'une superoxyde dismutase de métal non identifié a été mise en évidence dans les mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae* la synthèse de cette enzyme étant sous le contrôle du génome cellulaire (53).

C. Enzymes à fer.

Chez les bactéries luminescentes *Photobacterium leiognathi* et *Photobacterium sepiæ*, les superoxyde dismutases sont des protéines à fer ; l'enzyme de poids moléculaire 37 000 est constituée de 2 chaînes polypeptidiques de taille identique (20 000) et contient 2 atomes de fer, les caractéristiques spectrales et les données de résonance paramagnétique électronique suggèrent que le fer se trouve à l'état ferrique (41) (42). Une superoxyde dismutase à fer est présente également chez *E. coli* ; ses propriétés struc-

turales sont voisines de celles des enzymes précédentes, mais l'enzyme ne contient qu'un seul atome de fer (43).

2. - PROPRIÉTÉS ENZYMATIQUES.

A. *Mesure de l'activité enzymatique.*

Du fait de la courte durée de vie du substrat, l'activité superoxyde dismutase ne peut généralement pas être obtenue directement, mais est mesurée par sa capacité à inhiber une réaction dépendante d' O_2^- . Dans un tel système, un générateur et un détecteur d' O_2^- doivent être présents : la sensibilité du test dépend de la capacité de la superoxyde dismutase à entrer en compétition avec le détecteur d' O_2^- . Expérimentalement, le générateur d'ion superoxyde est le plus souvent le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase/oxygène : les révélateurs couplés à cette réaction sont le ferricytochrome c réduit en ferrocytochrome c (11), le tétranitrométhane réduit en anion nitroforme (54) (55) (56), le bleu de tétrazolium réduit en bleu formazan (57), l'adrénaline oxydée en adrénochrome (26). Le générateur peut être également la réaction d'oxydation des flavines photoréduites (16) : l'utilisation de cette réaction et du bleu de tétrazolium a permis la mise au point d'une technique permettant de révéler *in situ* sur gel de polyacrylamide l'activité superoxyde dismutase (57) : Après électrophorèse d'un échantillon actif, le gel est successivement incubé dans des solutions de nitrobleu tétrazolium et riboflavine, puis irradié par une lampe ultraviolette ; une coloration bleue se développe sur le gel sauf aux positions correspondant aux bandes de superoxyde dismutase où des plages blanches apparaissent par suite de l'inhibition de la réaction de coloration.

B. Propriétés cinétiques et mécanisme.

Les propriétés cinétiques des érythrocupréines bovine et humaine ont pu être étudiées grâce à la technique de radiolyse par électrons accélérés (58) (59) (60). Cette technique consiste à bombarder pendant un temps très bref (de l'ordre de 10^{-6} s) une substance par un faisceau d'électrons accélérés : il y a formation d'espèces transitoires que l'on peut identifier et suivre dès la fin du « pulse » si l'on dispose d'un appareil de détection convenable.

L'irradiation de l'eau conduit à la formation des espèces $H^\cdot$, $OH^\cdot$, e^- solvaté. En présence d'oxygène on obtient notamment :



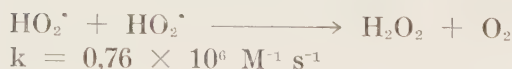
Par cette technique permettant d'obtenir de fortes concentrations d' $O_2^{\cdot-}$ ($\leq 10^{-4}$ M), les physico-chimistes ont pu identifier $O_2^{\cdot-}$ et $HO_2^\cdot$, obtenir leurs spectres, mesurer le pK et les potentiels d'oxydoréduction, et calculer les constantes de vitesse des réactions de dismutation spontanée d'ordre 2 dans une gamme étendue de pH (61) (62) (63) (64) (65) :

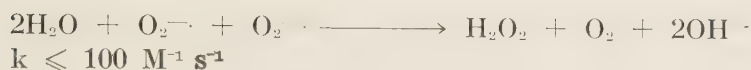
$$O_2^{\cdot-} (\epsilon_{250 \text{ nm}} = 1\,970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

$$HO_2^\cdot (\epsilon_{240 \text{ nm}} = 1\,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$



$$E^{\circ'}_{O_2/O_2^{\cdot-}} = -0,5 \text{ V}$$





Les expériences conduites en présence d'enzyme démontrent que l'érythrocupréine catalyse ces réactions selon une réaction d'ordre 1 par rapport à $\text{O}_2^{\cdot-}$; à chaque pH la vitesse de décroissance des radicaux est proportionnelle à la quantité d'enzyme. La constante de vitesse de la réaction enzymatique calculée en divisant la constante de vitesse de la réaction d'ordre 1 par la concentration en enzyme et en tenant compte de la dismutation spontanée vaut $1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et se trouve être indépendante du pH (pH 5,5 à pH 9,5). Dernièrement ces expériences ont été reprises en utilisant des quantités équivalentes de substrat et d'érythrocupréine et en étudiant ensuite les variations d'absorption au niveau du groupement prosthétique de l'enzyme à 680 nm ; une diminution réversible d'absorption peut être observée suggérant un mécanisme d'oxydo-réduction du métal pendant le cycle catalytique (66).

Peu d'informations ont été obtenues sur les propriétés cinétiques des enzymes à Mn et à Fe bien qu'un article récent tende à prouver que toutes les superoxyde dismutases présentent des propriétés cinétiques comparables (67). Enfin, dernier volet des propriétés catalytiques de l'enzyme, la réversibilité de la réaction :



a pu être mise en évidence à pH basique grâce à une réaction de compétition avec le tétranitrométhane qui possède pour $\text{O}_2^{\cdot-}$ une affinité comparable à celle de l'enzyme (55) (68).

3. - FONCTION BIOLOGIQUE.

McCord, Keele et Fridovich ont attribué aux superoxyde dismutases un rôle fondamental de protection cellulaire au cours de l'évolution contre les effets toxiques des radicaux superoxyde pouvant être produits par réduction de l'oxygène durant les phénomènes de respiration (69) ; la répartition de l'enzyme a été recherchée dans toute une gamme de microorganismes : les bactéries aérobies qui peuvent pousser en présence d'air et utilisent l'oxygène comme accepteur d'électrons possèdent toutes un taux élevé et constant de superoxyde dismutase ; les bactéries anaérobies/aérobies tolérantes qui n'utilisent pas l'oxygène comme accepteur d'électrons mais peuvent l'éliminer en partie par un système oxydasique non couplé à la synthèse d'ATP possèdent également une activité superoxyde dismutase mais à un taux plus faible ; enfin les bactéries anaérobies strictes ne possèdent pas cette enzyme. Chez *E. coli*, Gregory a pu montrer que l'enzyme était inductible par l'oxygène : le taux de superoxyde dismutase est augmenté vingt fois quand on passe d'une culture sous azote à une culture sous une pression de 5 atm. d'oxygène (70). Au cours du même travail, une relation entre la survie d'une bactérie soumise à de fortes pressions d'oxygène et son taux d'enzyme cellulaire a pu être établie : des cultures de *Streptococcus faecalis* contenant des taux différents de superoxyde dismutases étaient placées sous une pression de 20 atm. d'oxygène après addition de puromycine pour supprimer tout phénomène d'induction enzymatique ; la mortalité diminue quand le taux de superoxyde dismutase augmente (70). On sait que l'oxygène augmente la toxicité d'un antibiotique la streptomigrine qui peut produire *in vitro* de l'ion superoxyde pendant un cycle d'oxydo-réduction (71) ; *E. coli* s'est révélée d'autant plus résistante

à l'action de l'antibiotique que son taux de dismutase était plus élevé (72). Cette fonction biologique des superoxyde dismutases est devenue encore plus apparente quand Gregory a pu montrer que chez *E. coli* l'enzyme à Fe était périplasmique et l'enzyme à Mn cellulaire et qu'ainsi une double protection contre l'ion superoxyde intracellulaire ou extracellulaire pouvait être obtenue (73).

En 1971, deux superoxyde dismutases avaient été isolées : l'érythrocupréine à cuivre des érythrocytes de mammifères et l'enzyme à manganèse de la bactérie *E. coli*.

Nous avons alors décidé de purifier et d'étudier la superoxyde dismutase d'un nouveau matériel, le champignon *Pleurotus olearius*. Le choix de ce matériel a été guidé d'une part par les propriétés de bioluminescence qu'exhibait ce champignon car des travaux menés conjointement dans le laboratoire suggéraient l'importance de l'ion superoxyde dans de tels phénomènes et il était intéressant d'autre part de connaître d'un point de vue évolutionnel le type de métal présent dans l'enzyme.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — CULTURE DES MATERIAUX BIOLOGIQUES

1.- CHAMPIGNON *PLEUROTUS OLEARIUS*.

La souche du basidiomycète *Pleurotus olearius* nous a été fournie par Monsieur le professeur Heim et provient des collections du Museum d'Histoire naturelle. La souche est repiquée et conservée sur un milieu solide contenant :

3,6 g Mycophil Agar (Bacterial, Biological Laboratories)
0,5 g Extrait de levure (Bacterial, Biological Laboratories)

pour 100 ml H₂O ajustés à pH 5,5.

Le milieu de croissance est constitué par :

20 g Mycophil Broth (Bacterial, Biological Laboratories)
5 g Extrait de levure (Bacterial, Biological Laboratories)
50 mg Chloramphenicol

pour 1 000 ml H₂O ajustés à pH 5,5.

Des bouteilles de 20 l placées à l'obscurité et à température ambiante et contenant 4 l de milieu sontensemencées à l'aide de précultures liquides préparées avec le même milieu en fioles de Roux ; le mycélium qui pousse sous forme d'une couche à l'interface air-liquide est récolté par filtration sur Büchner au bout de périodes allant de vingt à quarante jours ; le rendement en mycélium humide est de l'ordre de 30 g par litre de milieu. Après lavage par plusieurs volumes d'eau, le mycélium est congelé et gardé à -20°C jusqu'à son utilisation.

Pendant la croissance, le champignon exhibe une faible luminescence bleu vert dont nous avons enregistré la distribution spectrale, présentée sur la fig. 1 (74) ; la réaction de bioluminescence *in vitro* a pu être étudiée par quelques groupes malgré la difficulté d'obtenir des extraits suffisamment actifs (75) (76) (77).

2. - BACTÉRIE PHOTOBACTERIUM LEIOGNATHI.

La bactérie marine *Photobacterium leiognathi* isolée par Boisvert (78) est cultivée à 28°C sur un milieu contenant :

8 g	Nutrient Broth
10 g	NaCl
14 g	Na_2HPO_4
2 g	KH_2PO_4

pour 1 000 ml H_2O à pH 7.

Les comptages sont effectués en étalant 0,1 ml d'une suspension bactérienne convenablement diluée avec du sérum physiologique sur des boîtes de Pétri placées à 28°C et contenant :

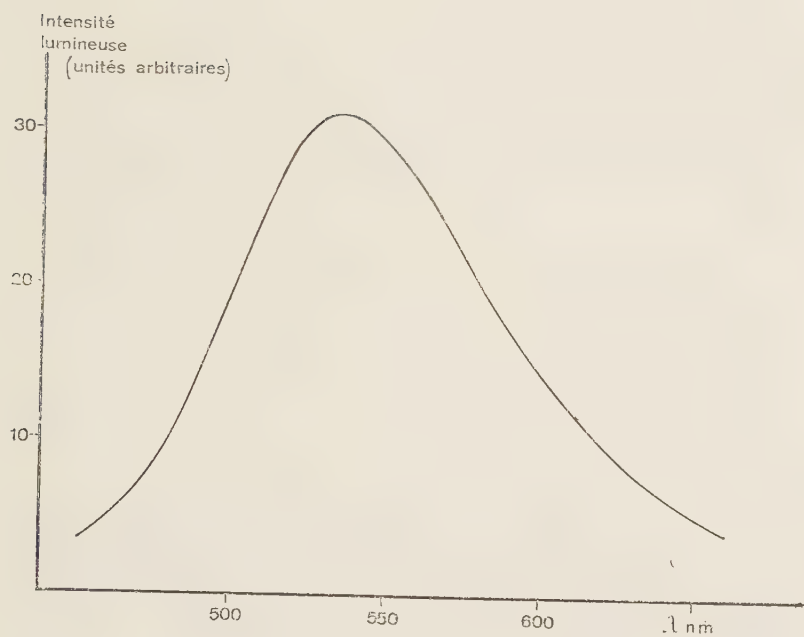


FIGURE 1

Luminescence *in vivo* d'une culture du champignon bioluminescent
Pleurotus olearius

8 g Nutrient Broth
10 g NaCl
15 g Agar

pour 1 000 ml H₂O à pH 7.

3. - BACTÉRIOPHAGE R₁₇.

Le phage est conservé et dilué dans une solution contenant :

6 g Na₂HPO₄
3 g KH₂PO₄
0,5 g NaCl
1 g NH₄Cl
10 ml CaCl₂ 0,01 M

pour 1 000 ml H₂O.

Le taux d'infection est mesuré en incubant pendant 10 mn à 38°C 0,1 ml d'une suspension de bactériophage avec 0,2 ml d'une culture de *E. coli* K GY 306 (5 × 10⁸ cellules/ml) poussée sur un milieu composé de :

10 g Trypticase
5 g Extrait de levure
10 g NaCl

pour 1 000 ml H₂O.

Après cette préincubation 3 ml d'agar mou constitué de :

8 g Agar
10 g Trypticase
5 g Extrait de levure
10 g NaCl

2 ml CaCl_2 1 M
5 ml Glucose 20 %

pour 1 000 ml H_2O

et maintenu à 45°C sont ajoutés à la suspension de micro-organismes. Le mélange est coulé et réparti uniformément sur une boîte de Pétri contenant 20 ml d'agar solide :

12 g Agar
10 g Trypticase
5 g Extrait de levure
10 g NaCl
2 ml CaCl_2 1 M
5 ml Glucose 20 %

pour 1 000 ml H_2O .

Les boîtes sont maintenues à 37°C et les phages comptés après 24 h.

II - MESURE DE L'ACTIVITE SUPEROXYDE DISMUTASE

Un dosage de l'activité superoxyde dismutase impliquant la réaction de chimiluminescence du luminol a été mis au point et utilisé systématiquement. L'appareil utilisé au Laboratoire pour la mesure des réactions lumineuses a été décrit en détail (29) : le photomultiplicateur utilisé est un 56 TUVF provenant de la Radiotechnique avec une photocathode du type S 20 ; il est alimenté sous une tension fixée généralement à 1 500 V (Oltronix) et relié à un pico-

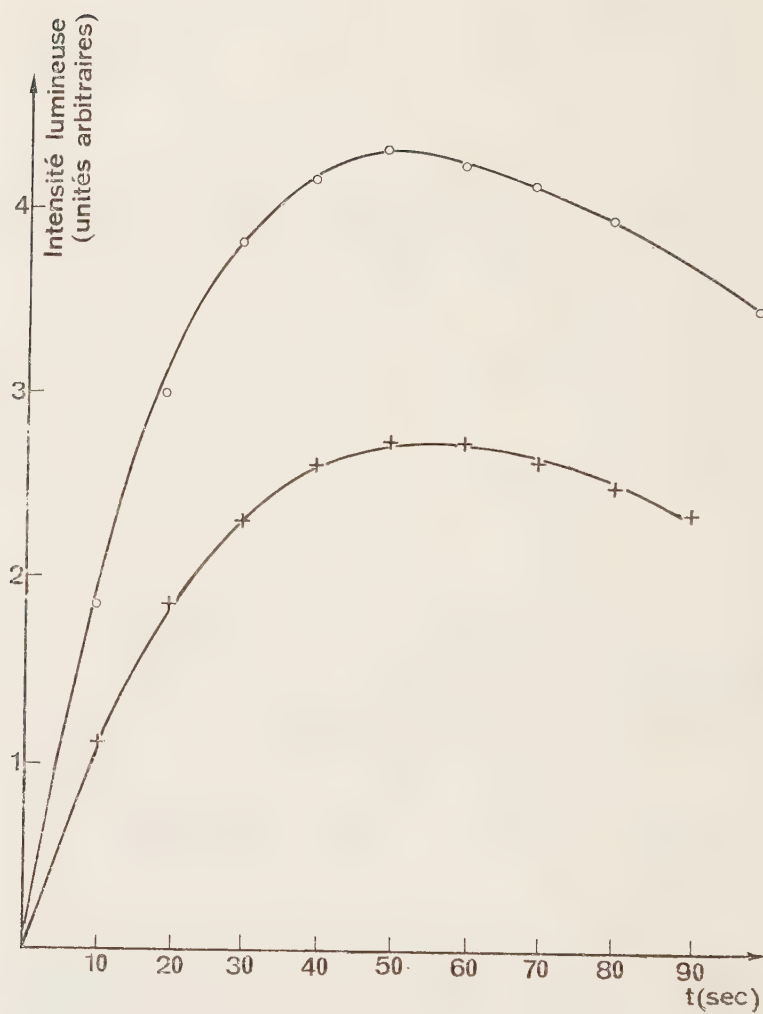


FIGURE 2

Dosage par chimiluminescence de l'activité superoxyde dismutase (-o-o- système sans superoxyde dismutase ; +-+ système avec 2×10^{-4} n moles superoxyde dismutase SODc de *Pleurotus olearius*).

ampèremètre Lemouzy PA 15 B ; l'appareil peut être étalonné en utilisant les standards de Hastings (79) ; les intensités lumineuses produites par la réaction sont de l'ordre de 10^7 à 10^8 quanta s^{-1} ml^{-1} .

Le mélange réactionnel introduit dans la cuve contient :

0,3 ml EDTA 10^{-3} M

0,3 ml Tampon glycine/NaOH 1 M pH 9

0,03 ml Luminol 10^{-2} M

0,005 ml Xanthine oxydase 1 mg/ml (Boehringer)

1,4 ml H_2O

la réaction est déclenchée par injection à l'aide d'une seringue de

1 ml Hypoxanthine $0,33 \times 10^{-5}$ M

L'intensité lumineuse obtenue est représentée sur la figure 2.

L'addition de superoxyde dismutase à ce système provoque une diminution de l'intensité lumineuse et le graphique de la figure 3 montre la diminution de l'intensité maximale de la réaction lumineuse en fonction de la quantité de superoxyde dismutase ajoutée ; une relation linéaire entre cette décroissance d'intensité et la quantité d'enzyme est obtenue jusqu'à un taux d'inhibition de 50 %. Arbitrairement, nous définissons dans notre système le dixième d'unité enzymatique comme la quantité d'enzyme provoquant une diminution moitié de l'intensité lumineuse maximale obtenue dans les conditions énoncées ci-dessus. La catalase peut inhiber également cette réaction de chimiluminescence du luminol, mais les quantités d'enzyme requises pour obtenir des inhibitions significatives sont largement supérieures aux quantités de superoxyde dismu-

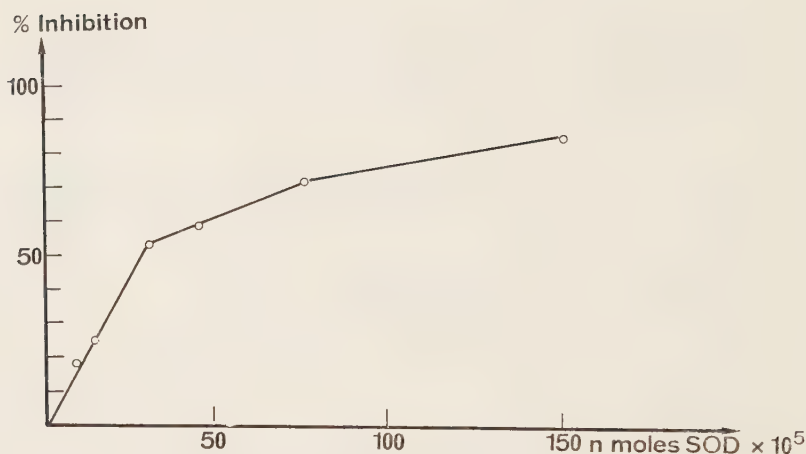


FIGURE 3

Inhibition par la superoxyde SODc de *Pleurotus olearius* de la réaction luminescente hypoxanthine/xanthine oxydase/oxygène/luminol.

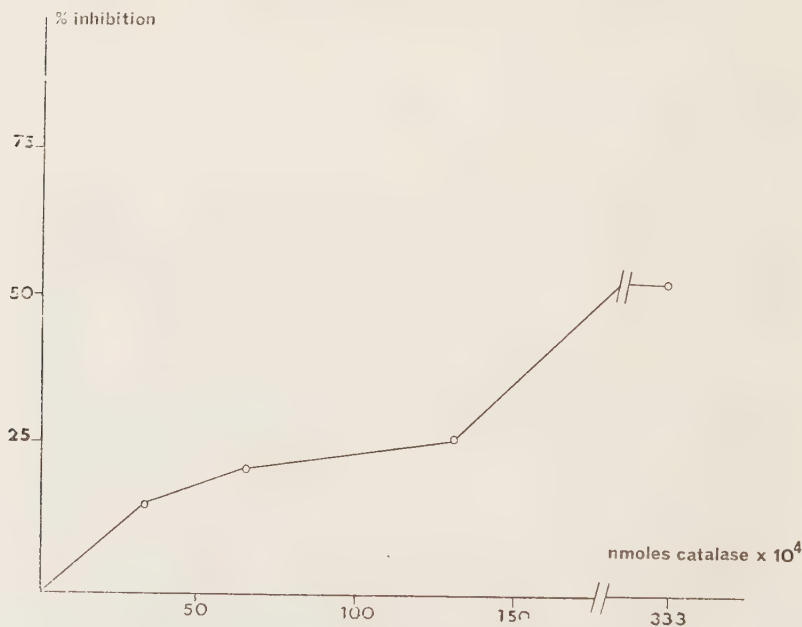


FIGURE 4

Inhibition par la catalase (Boehringer) de la réaction luminescente hypoxanthine/xanthine oxydase/oxygène/luminol.

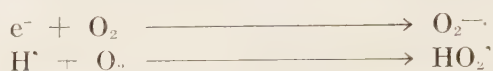
tase, ce qui limite les risques d'interférence au cours du dosage (fig. 4).

III — TECHNIQUE DE RADIOLYSE PAR ELECTRONS ACCELERES

Les études cinétiques de la superoxyde dismutase SODc de *P. olearius* ont été effectuées sur l'appareil de radiolyse par électrons accélérés construit au laboratoire de radiobiologie du Royal Marsden Hospital, Sutton, Angleterre (professeur E. Martin Fielden). L'appareil est constitué de deux parties principales : premièrement, un dispositif permettant la production de « pulses » d'électrons de haute énergie, focalisés de manière homogène sur la cible à étudier ; deuxièmement, un dispositif d'analyse spectroscopique rapide permettant de suivre les variations spectrales de la cible dès la fin du « pulse ». Les électrons accélérés sont produits par un accélérateur linéaire (MEL Equipment Co, Crawley, Sussex, England) délivrant des « pulses » d'une durée de 1,6 μ s et d'une énergie maximale de 4,3 MeV ; la solution à étudier est placée dans une cuve cylindrique en quartz de haute pureté (volume de la cellule 2 ml ; chemin optique 0,7 cm) ; cette cuve fait partie d'un système spectrophotométrique à simple faisceau permettant de suivre de faibles variations d'absorption ($OD \geq 0,001$) entre 1 μ s et 1 mn après le « pulse » (lampe au xénon de puissance 400 W, monochromateurs Bausch et Lomb, photomultiplicateur IP 28, oscilloscope Tektronix 7704 A, matériel photographique Polaroid).

Nous allons voir rapidement les principaux événements conduisant à la formation d'ions superoxyde : la radiolyse de l'eau produit les espèces principales e^- solvaté, $H^\cdot$, $OH^\cdot$.

En présence d'oxygène (solution aérée) il se produit les réactions :



Les radicaux hydroxyle très actifs sont convertis en O_2^- par addition de formiate de sodium :



La formation et la disparition de l'ion superoxyde O_2^- sont suivies au cours du temps à 250 nm où cette espèce présente un coefficient d'extinction moléculaire de $2\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (62). Les concentrations initiales d' O_2^- produites varient en fonction de la modulation énergétique du « pulse » jusqu'à une valeur maximale de $2 \times 10^{-4}\text{ M}$. Nous remarquerons dès maintenant que les réactions de dismutation spontanée de l'ion superoxyde que nous avons décrites dans l'introduction peuvent être négligées dans nos conditions d'études expérimentales en présence de superoxyde dismutase, à cause de leur lenteur relative.

IV — SYSTEMES PRODUCTEURS D'ION SUPEROXYDE

1. - RÉDUCTION MONOÉLECTRONIQUE DE L'OXYGÈNE PAR LES FLAVINES RÉDUITES.

La solution est composée de :

FMN 10^{-4} M

EDTA 10^{-3} M

Tampon phosphate 10^{-2} M pH 7

La photoréduction est produite par irradiation à 365 nm dans un spectrofluorimètre Zeiss ; la réduction se produit rapidement et peut-être visualisée par la décroissance de l'intensité de fluorescence du FMN à 530 nm ; à l'issue de la réduction, la solution est agitée vigoureusement et l'on obtient rapidement une réoxydation complète ; le processus peut être répété de nombreuses fois sans modification structurale importante du FMN.

Dans d'autres cas, afin d'obtenir de plus hauts rendements d'ion superoxyde, l'irradiation peut être effectuée à 365 nm par une lampe B₁₀₀A (Ultraviolet Products, Inc.) sur des solutions continuellement agitées : l'énergie reçue par la solution est de 5 500 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$.

2. - PRODUCTION ENZYMATIQUE D'IONS SUPEROXYDE.

Le système enzymatique utilisé est toujours la réaction hypoxanthine/xanthine oxydase/oxygène.

La solution contient :

0,3 ml EDTA 10^{-3} M
0,3 ml tampon phosphate 1 M pH 7,8
2,1 ml H₂O
0,05 ml xanthine oxydase (1 mg/ml)

La réaction est déclenchée par injection de :

0,3 ml hypoxanthine 10^{-3} M.

V — TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

Un anti-sérum contre la superoxyde dismutase SODc de *P. olearius* a été préparé dans le laboratoire du docteur

F. Lacour (Institut Gustave Roussy — Villejuif) par deux injections successives de 3 mg de superoxyde dismutase électrophorétiquement pure au lapin. L'anti-sérum mis en ampoules scellées et conservé à -20°C est utilisé sans purification ultérieure. Les expériences d'immunodiffusion et immunoélectrophorèse sont réalisées avec un équipement complet GELMAN. L'immunodiffusion conduite selon le protocole de Ouchterlony est effectuée dans une gélose constituée de :

1 g Difco Noble Agar
1 g NaCl
98 ml H_2O

La gélose utilisée pour les immunoélectrophorèses est constituée par :

1,5 g Difco Noble Agar
75 ml H_2O
25 ml Tampon tris-barbital 5×10^{-2} M pH 8,8

les migrations électrophorétiques sont faites dans un tampon tris-barbital 5×10^{-2} M pH 8,8 pendant 45 mn sous un courant moyen de 4 mA/lame.

Les arcs de précipitation sont observés sans coloration ultérieure après une journée d'incubation en atmosphère humide à température ordinaire.

VI — DOSAGES D'ENZYMES

1. - ALCOOL DÉSHYDROGÉNASE.

L'activité des alcool déshydrogénases de foie de cheval et de levure (Boëhringer) est mesurée par augmentation

de la densité optique à 340 nm de 1 ml d'une solution constituée par :

0,5 ml NAD⁺ 35 mg/ml
1 ml Tampon tris 1 M pH 8
2 ml Ethanol 1 %
15 ml H₂O

2. PEROXYDASE DE RAIFORT.

L'activité de la peroxydase de Raifort (Boëhringer) est mesurée par augmentation de la densité optique à 380 nm d'une solution contenant :

2,9 ml Tampon phosphate 0,1 M pH 7
0,05 ml H₂O₂ (H₂O₂ 110 volumes 1 µl/mlH₂O)
0,05 ml pyrogallol 2,5 mg/ml

3. - RIBONUCLÉASE PANCRÉATIQUE.

L'activité de la ribonucléase est mesurée par augmentation de la densité optique à 260 nm d'une solution contenant :

1,8 ml Tampon phosphate 10⁻² M pH 7 ; EDTA 10⁻³ M
0,2 ml tRNA brut (1 mg/ml).

RÉSULTATS

CHAPITRE I

PURIFICATION
DES SUPEROXYDE DISMUTASES

TABLEAU I

Purification de l'activité superoxyde dismutase du champignon *Pleurotus olearius*.

ETAPE	DO ₂₈₀	DO ₂₆₀	V _{m1}	Act/ml	Act/DO ₂₈₀	Act. totale
Extrait brut	14	24	6000	60	4	$3,6 \times 10^5$
Extrait concentré	164	290	400	760	5	3×10^5
Extrait après dialyse	39	46	680	190	5	$1,4 \times 10^5$
30 - 70 % sat. $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	139	157	50	5300	38	$2,7 \times 10^5$
Avant DEAE-cellulose	82	93	73	3000	36	$2,2 \times 10^5$
Après DEAE-cellulose Tubes 24-56	1,16	1,17	124	1500	1300	$1,9 \times 10^5$
Avant G 100	7,8	5	11	17000	2200	$1,8 \times 10^5$
Après G 100 Tubes 78-89	1,14	0,57	40	3400	3000	$1,3 \times 10^5$

I — PURIFICATION DE L'ACTIVITE SUPEROXYDE DISMUTASE

Les différentes étapes de cette purification sont résumées dans le tableau I.

1. - OBTENTION D'UN EXTRAIT BRUT CONCENTRÉ.

800 g de mycélium humide sont dispersés et homogénéisés dans 4 l de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 à l'aide d'un mixer Braun, puis broyés à 3°C par lots de 500 ml pendant 4 mn dans un broyeur à couteaux Virtis à vitesse maximale ; la préparation est centrifugée à 3°C et à 11 000 tours/mn pendant 45 mn (centrifugeuse SORVALL rotor GS-A) ; le culot est repris dans 2 l de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 et réextrait dans les mêmes conditions ; après centrifugation, les surnageants sont combinés et sont concentrés par évaporation rotative sous vide à 3°C (rotavapor Büchi) ou par ultrafiltration sur un Diaflow à fibres

(Aminco CH₈, fibres H 1 DP 10) jusqu'à un volume final de 400 ml.

Après concentration, l'extrait est dialysé pendant 72 h contre de grands volumes de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 plusieurs fois renouvelés ($V = 10$ l) ; durant cette dialyse, d'abondants précipités inactifs se forment dans le sac et sont éliminés par centrifugation (11 000 t/mn pendant 15 mn).

2. - PRÉCIPITATION FRACTIONNÉE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

143 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-30 % saturation) sont ajoutés au froid sous agitation magnétique à l'extrait dialysé ($V = 680$ ml) ; à la fin de l'addition, l'agitation est poursuivie pendant 30 mn, puis la suspension est centrifugée (60 mn à 11 000 t/mn). La précipitation est poursuivie par addition dans les mêmes conditions de 190 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30-70 % de saturation) et le nouveau précipité abondant qui se forme est centrifugé (60 mn à 11 000 t/mn). Les culots sont repris et solubilisés dans 40 ml de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 : on constate que l'activité précipite intégralement dans la fraction 30-70 % ; cette fraction est dialysée pendant 15 h contre 5 l de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7.

3. - PASSAGE SUR DEAE - CELLULOSE.

L'échantillon dialysé est déposé sur une colonne de DEAE — cellulose 32 équilibrée dans un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 ; la colonne est éluée par le même tampon : l'activité est faiblement retenue, les fractions 24 à 56 sont combinées et contiennent la quasi totalité de l'activité déposée sur la colonne (fig. 5) ; ces fractions sont concentrées par dialyse contre une solution saturée et neutralisée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



FIGURE 5

Colonne DEAE-Cellulose ($V = 150$ ml) équilibrée et éluée par un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7; des fractions de 4 ml (80 g^{ts}) sont recueillies, la densité optique à 280 nm (o-o-) et l'activité superoxyde dismutase (+-+) sont mesurées.

1. - FILTRATION SUR SEPHADEX G-100.

Le précipité collecté par centrifugation est repris dans 10 ml de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 et déposé sur une colonne de Sephadex G-100 éluée par un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7. Un pic d'activité se superposant parfaitement à l'absorption protéique est obtenu ; les fractions 78 à 89 sont rassemblées et précipitées par dialyse contre $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturé et neutralisé en vue de traitements et utilisations ultérieurs (fig. 6).

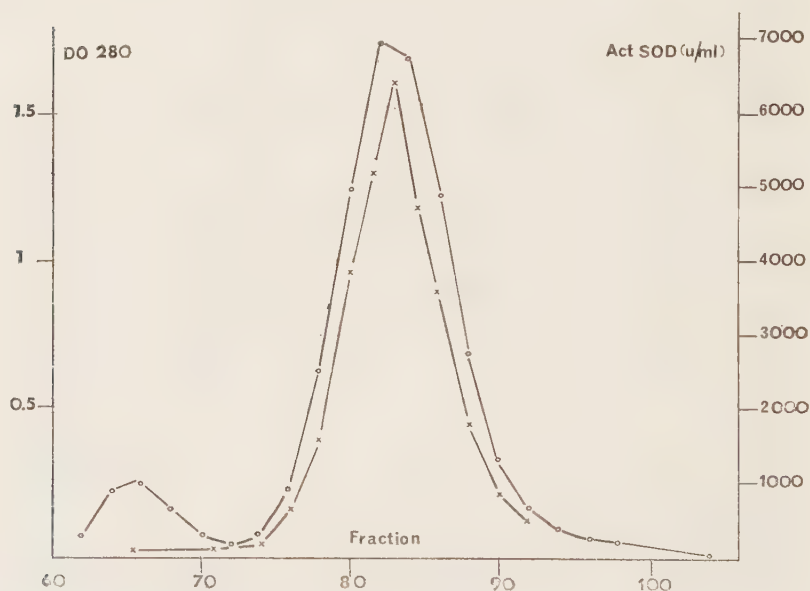
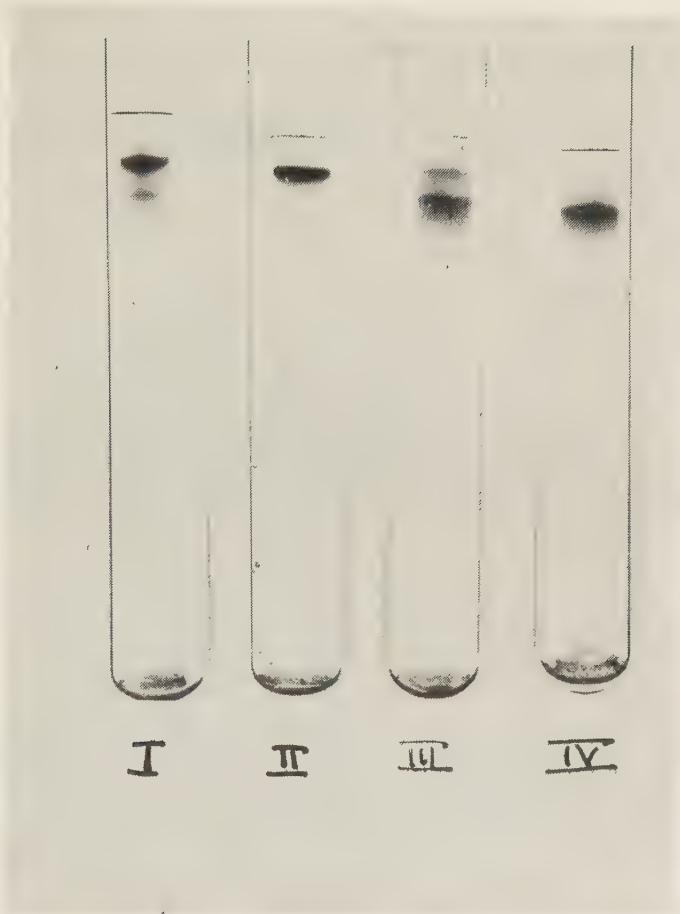


FIGURE 6

Colonne G 100 (h = 55 cm d = 4 cm) éluée par un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 ; des fractions de 3,5 ml (70 gts) sont recueillies ; la densité optique à 280 nm (o-o-) et l'activité superoxyde dimutase (x-x-) sont mesurées.



PHOTOGRAPHIE I

Superoxyde dismutases de Pleurotus olearius :

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (7,5 %) dans un tampon Tris-glycine pH 8,5 ; les protéines sont révélées après migration (3ma/tube pendant 45 mn.) par coloration avec le bleu de Coomassié.

Gel 1 : Purification de l'activité superoxyde dismutase après G 100 ; 20 γ protéine.

Gel 2 : Fraction SODc (Tubes 13-26) après 1^{re} colonne QAE-Sephadex ; 20 γ protéine.

Gel 3 : Tubes 31 - 41 après 1^{re} colonne QAE-Sephadex ; 25 γ protéine.

Gel 4 : Fraction SODm (Tubes 31-40) après 2^e colonne QAE-Sephadex ; 15 γ protéine.

5. - GELS DE POLYACRYLAMIDE.

La pureté de la préparation après filtration sur Sephadex G-100 est analysée par électrophorèse sur gels de polyacrylamide à pH 8,5 selon la méthode classique de Davis (80) : les gels montrent la présence de deux bandes protéiques (Photographie I). Du fait de la proximité des bandes, la démonstration *in situ* de l'activité superoxyde dismutase selon la technique de Beauchamp est inopérante et ne révèle qu'une plage diffuse d'activité difficile à relier à l'une ou l'autre bande (57). Le découpage du gel en fines rondelles a permis de démontrer que l'activité superoxyde dismutase était en fait associée aux deux bandes dans un rapport apparemment voisin de leurs intensités respectives (fig. 7).

II — SEPARATION DES DEUX ISOENZYMES

Nous avons poursuivi la purification de l'activité superoxyde dismutase obtenue après la colonne de Sephadex G-100 et avons pu séparer les deux isoenzymes par chromatographie sur une colonne de QAE-Sephadex.

1. - 1^{re} COLONNE QAE-SEPHADEX.

Une aliquote de la préparation conservée dans le sulfate d'ammonium est, après centrifugation, reprise dans 2 ml de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7,5 puis dialysée contre ce même tampon. Après dialyse, l'échantillon est déposé sur une colonne de QAE-Sephadex équilibrée dans un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7,5 et éluée par un gradient linéaire de force ionique : deux pics d'activité enzy-

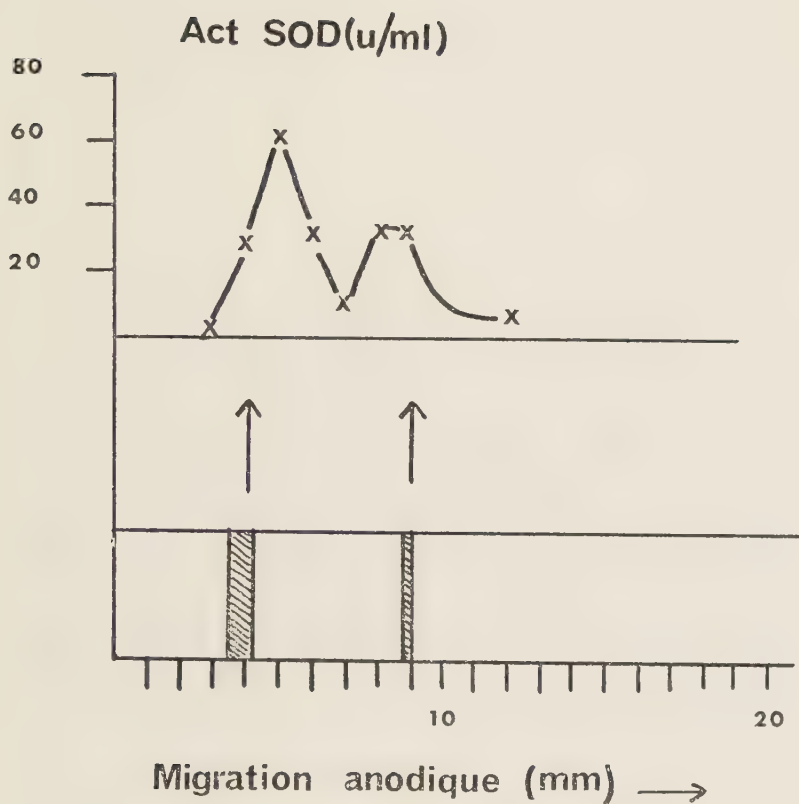


FIGURE 7

Révélation de l'activité superoxyde dismutase après G 100 :
 le gel de polyacrylamide après électrophorèse à pH 8,5 de la préparation
 obtenue est découpé en rondelles de 1 mm d'épaisseur moyenne qui sont
 écrasées et incubées pendant 16 h dans 0,4 ml de tampon phosphate
 10^{-2} M pH 7 ; l'activité superoxyde dismutase (+-+) est mesurée.

matique sont partiellement séparés (fig. 8). Les fractions 13/26 et 31/41 correspondant à chacun des pics sont rassemblées et soumises à une électrophorèse sur gels de polyacrylamide : la fraction 13/26 que nous symboliserons par SODc apparaît pure, alors que la fraction 31/41 contient les deux activités (photographie I). Le tableau II résume cette purification partielle.

2. - 2^e COLONNE QAE-SEPHADEX.

La fraction 31/41 après concentration par dialyse contre le sulfate d'ammonium était reprise et dialysée contre un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7,5 puis chromatographiée sur une nouvelle colonne de QAE-Sephadex dans les mêmes conditions que précédemment. Nous obtenons un profil analogue à celui de la colonne précédente ; l'analyse sur gel de polyacrylamide montre que le premier pic (tubes 18/28) correspond à la superoxyde dismutase SODc, alors que le deuxième pic (tubes 31/40) contient essentiellement la deuxième bande d'activité symbolisée par SODm, SODc étant encore présente à l'état de traces (photographie I). Le tableau III présente les données de cette résolution.

III — BILAN DE LA PURIFICATION

L'activité superoxyde dismutase peut être purifiée relativement facilement par les techniques classiques enzymologiques. Cette activité se résout en deux isoenzymes symbolisées SODc et SODm qui peuvent être correctement séparées par chromatographie sur QAE-Sephadex : la frac-

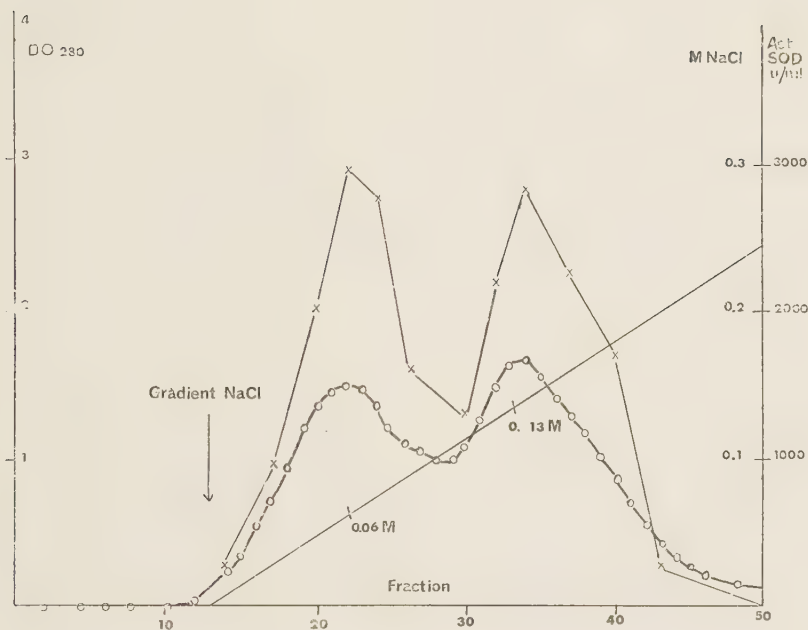


FIGURE 8

Colonne QAE-Sephadex ($V = 10$ ml) équilibrée dans un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7,5. Des fractions de 1 ml (20 gts) sont recueillies ; la colonne après dépôt de l'échantillon est lavée par 10 ml de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7,5 puis éluée par un gradient linéaire de force ionique entre 30 ml de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7,5 et 30 ml de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7,5 contenant NaCl 0,5 M : la densité optique à 280 nm (-o-o-) et l'activité superoxyde dismutase (+-+) sont mesurées.

TABLEAU II

Séparation partielle de l'activité superoxyde dismutase sur QAE-Sephadex.

ETAPE	DO ₂₈₀	DO ₂₆₀	V _{m1}	Act/ml	Act/DO ₂₈₀	Act. totale
Echantillon déposé	12,4	6,6	2,5	23000	1850	57 000
Tubes 13 - 26 (SODc)	0,96	0,47	11	1800	1800	20 000
Tubes 31 - 41	1,26	0,69	9	2200	1700	20 000

TABLEAU III

Séparation complète de l'activité superoxyde dismutase sur QAE-Sephadex.

ETAPE	DO ₂₈₀	DO ₂₆₀	V _{m1}	Act/ml	Act/DO ₂₈₀	Act. totale
Echantillon	2,9	1,64	3	4200	1500	12 600
Tubes 18 - 28 (SODc)	0,264	0,16	10	390	1500	3 900
Tubes 31 - 40 (SODm)	0,2	0,1	9	360	1800	3 200

tion SODc est électrophorétiquement pure, alors que SODm contient encore quelques traces contaminantes de SODc. La coloration sur gels de polyacrylamide et la séparation sur QAE-Sephadex montrent que SODc est approximativement trois fois plus abondante que SODm ; les deux isoenzymes présentent des activités spécifiques comparables.

CHAPITRE II

PROPRIÉTÉS STRUCTURALES
ET ENZYMATIQUES

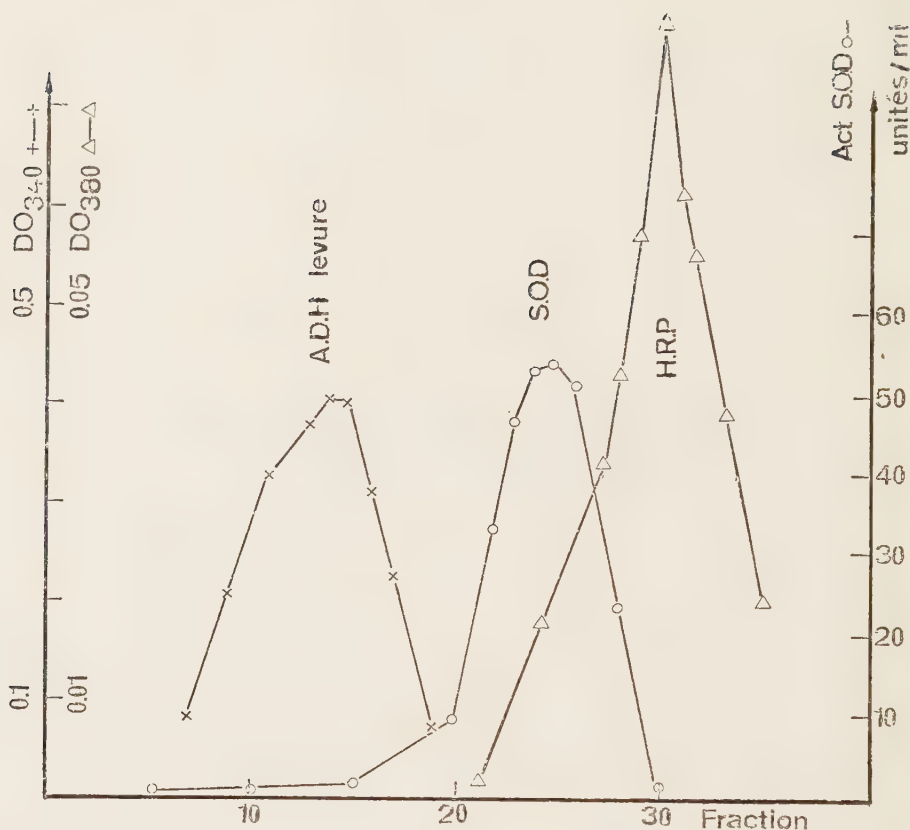


FIGURE 9

Coefficient de sédimentation de SODc.

La centrifugation est effectuée dans une ultracentrifugeuse Beckman Spinco L2 - 65 B avec le rotor SW 65 K. Des gradients linéaires continus de saccharose (volume final 5,1 ml) sont préparés entre 2,55 ml de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 contenant 20 % saccharose (poids/volume) et 2,6 ml de tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 contenant 5 % saccharose (poids-volume). 0,07 ml d'une solution contenant la superoxyde dismutase, l'alcool deshydrogenase de levure et la peroxydase de Raifort sont déposés au sommet du gradient ; la centrifugation est effectuée à 45 000 t/mn pendant 16 h à 3° C ; après centrifugation, des fractions de 0,12 ml sont recueillies et testées pour les différentes enzymatiques (matériels et méthodes).

I — PROPRIETES STRUCTURALES

1. - POIDS MOLÉCULAIRE ET STRUCTURE QUATERNAIRE.

A) *Coefficient de sédimentation.*

La constante de sédimentation de la superoxyde dismutase SODc, mesurée par centrifugation sur un gradient continu de saccharose en présence d'alcool déshydrogénase de levure ($S = 7,4$) et de peroxydase de Raifort ($S = 3,07$) selon la technique de Martin et Ames est de $4,5$ S (fig. 9)(81) ; malgré les limitations de la méthode, le poids moléculaire de l'enzyme peut être calculé par l'équation

$$\frac{S_1}{S_2} = \left| \frac{PM_1}{PM_2} \right|^{2/3} \text{ et vaut } 76\,000 \text{ (82). La constante de}$$

sédimentation pour la superoxyde dismutase SODm est trouvée égale à $4,6$ S, ce qui conférerait à l'enzyme un poids moléculaire de $78\,000$. Les mesures des constantes de sédimentation des deux enzymes ont été également effectuées

sur des gradients continus de saccharose contenant du mercaptoéthanol 10^{-3} M, après dépôt d'échantillons de superoxyde dismutases dialysées contre cet agent réducteur et ont confirmé les valeurs obtenues précédemment.

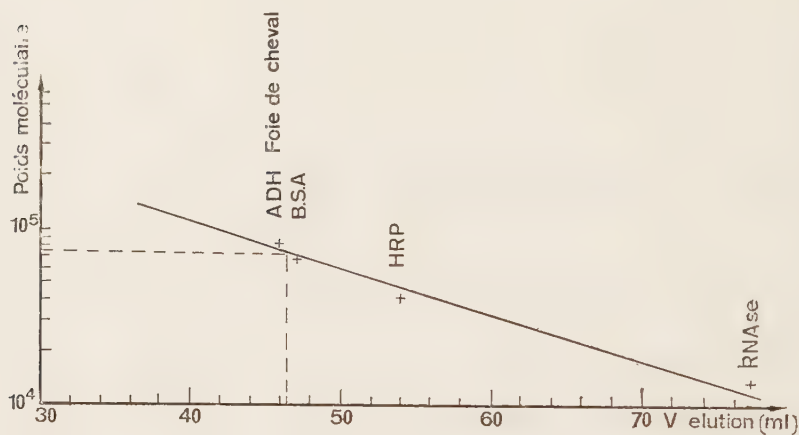


FIGURE 10

Poids moléculaire de SODc par filtration sur Sephadex G 100

Une colonne de Sephadex G 100 ($h = 97$ cm $d = 1,2$ cm) est utilisée et éluée par un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7. Les échantillons protéiques sont déposés dans un volume de 0,5 ml; des fractions de 1,9 ml sont recueillies et la position de la protéine repérée par son activité enzymatique (SODc) ou son absorption à 280 nm (marqueurs); les marqueurs utilisés sont l'ADH de foie de cheval (80 000), la serum albumine bovine (68 000), la peroxydase de Raifort (40 000), la ribonucléase pancréatique (13 700); le volume d'exclusion ($V = 37$ ml) est obtenu par passage d'une solution de bleu dextran repérée à la sortie de la colonne par mesure de la densité optique à 630 nm.

B) *Filtration sur Sephadex G-100.*

Une autre estimation du poids moléculaire de SODc a été effectuée par la technique de filtration sur tamis moléculaire ; malgré les limitations inhérentes à la méthode, une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire et le volume d'élution d'une protéine peut être établie (83). Cette méthode utilisant le Sephadex G-100, indique un poids moléculaire voisin de 75 000 (fig. 10).

C) *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.*

Le poids moléculaire des subunités des superoxyde dismutases SODc et SODm a été mesuré par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS selon le protocole expérimental de Weber et Osborn (81) ; les superoxyde dismutases et les échantillons protéiques de calibration (0,1 mg/ml) sont incubés 15 mn à 70°C dans un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 contenant 1 % SDS et 1 % mercaptoéthanol. La fig. 11 représentant le logarithme du poids moléculaire des chaînes polypeptidiques en fonction de leurs mobilités est une droite ; les deux superoxyde dismutases SODc et SODm donnent chacune une seule chaîne de mobilité 0,675 correspondant à un poids moléculaire de 20 000.

D) *Chromatographie sur DEAE-cellulose dans l'urée 7 M.*

1 ml d'une solution de superoxyde dismutase SODc électrophorétiquement pure ($DO_{280} = 5,53$) est dialysée pendant 15 h à température ambiante contre un tampon phosphate 10^{-3} M pH 7 additionné de mercaptoéthanol 10^{-3} M et d'urée 7 M. L'échantillon qui ne présente plus aucune activité enzymatique est déposé sur une colonne de DEAE

— cellulose équilibrée dans ce même tampon ; l'élution est effectuée par un gradient de force ionique en présence d'urée 7 M, le profil d'absorption représenté sur la fig. 12 révèle la présence de deux pics protéiques suggérant l'existence de deux types de subunités.

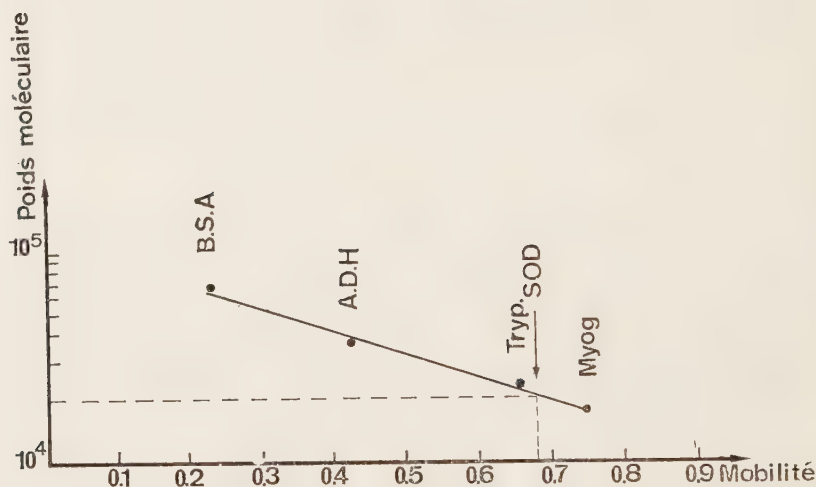


FIGURE 11

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de SODc et SODm en présence de SDS.

0,05 ml des solutions étalons (serum albumine bovine 68 000 ; alcool deshydrogenase de levure 40 000 ; trypsine 23 300 ; myoglobine de cheval 17 200) et des superoxyde dismutases SODc et SODm sont déposées après dissociation au sommet de gels contenant 10 % acrylamide ; l'électrophorèse est effectuée pendant 3 heures à une intensité de 8 mA/tube dans un tampon phosphate (NaH_2PO_4 , H_2O 7,8 g ; Na_2HPO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$ 38,6 g) contenant 2 g/l de SDS ; les gels sont colorés par le bleu de Coomassie, pendant 12 heures, puis décolorés dans des bains d'acide acétique à 7 %.

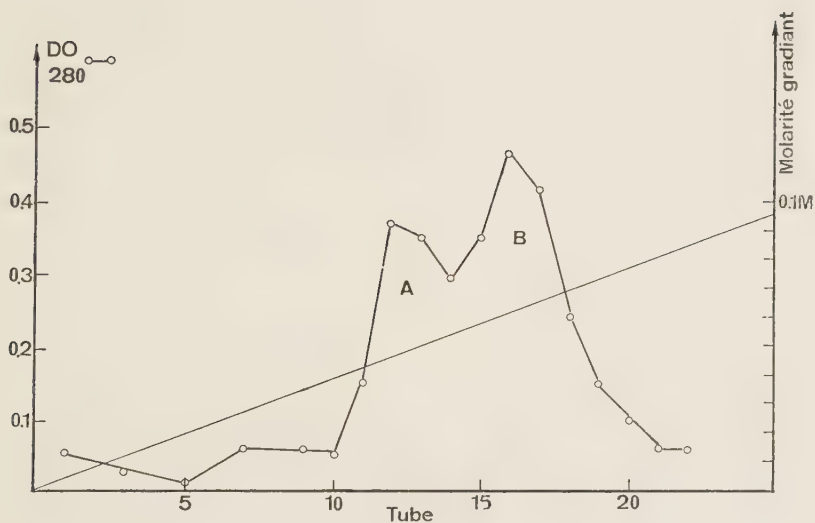


FIGURE 12

Chromatographie de SODc sur DEAE cellulose dans l'urée 7 M :

La colonne de DEAE cellulose ($h = 6$ cm, section 1 cm^2) est équilibrée dans un tampon phosphate 10^{-3} M pH7 contenant du mercaptoéthanol 10^{-3} M et de l'urée 7 M. L'échantillon SODc après dialyse contre ce tampon est déposé sur la colonne qui est éluée par un gradient linéaire entre 45 ml de tampon phosphate 10^{-3} M pH 7, mercaptoéthanol 10^{-3} M, Urée 7 M et 45 ml de tampon phosphate 0,5 M pH 7, mercaptoéthanol 10^{-3} M, Urée 7 M ; des fractions de 0,75 ml sont recueillies et l'absorption à 280 mm mesurée.

Cette observation est étayée et confirmée par électrophorèse sur gels de polyacrylamide en présence d'urée 7 M. Le tableau IV montre que les pics A et B soumis à une telle électrophorèse présentent des bandes de mobilités électrophorétiques distinctes que l'on retrouve dans l'échantillon dialysé avant passage sur la colonne. La superoxyde dismutase SODm a été soumise au même traitement dans l'urée 7 M et contrairement à la première enzyme, ne donne qu'une seule bande sur gel de polyacrylamide (tableau IV).

2. - POINT ISOÉLECTRIQUE.

Le point isoléctrique de la superoxyde SODc est mesuré par la technique d'électrofocalisation. Un échantillon de superoxyde dismutase ($V = 0,2$ ml, activité = 3000 unités/ml) est dialysé pendant cinq heures contre une solution de glycine 1 % (poids/volume), puis introduit dans une colonne d'électrofocalisation. Le point isoélectrique obtenu est voisin de pH 7 (fig. 13).

3. - COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

Un échantillon de superoxyde dismutase SODc est dialysé exhaustivement contre de l'eau distillée, puis lyophilisé à sec ; le résidu est hydrolysé pendant vingt-quatre heures dans HCl 6 N à 110°C ; l'analyse était effectuée sur un analyseur automatique d'acides aminés Technicon. La composition en acides aminés est donnée dans le tableau V.

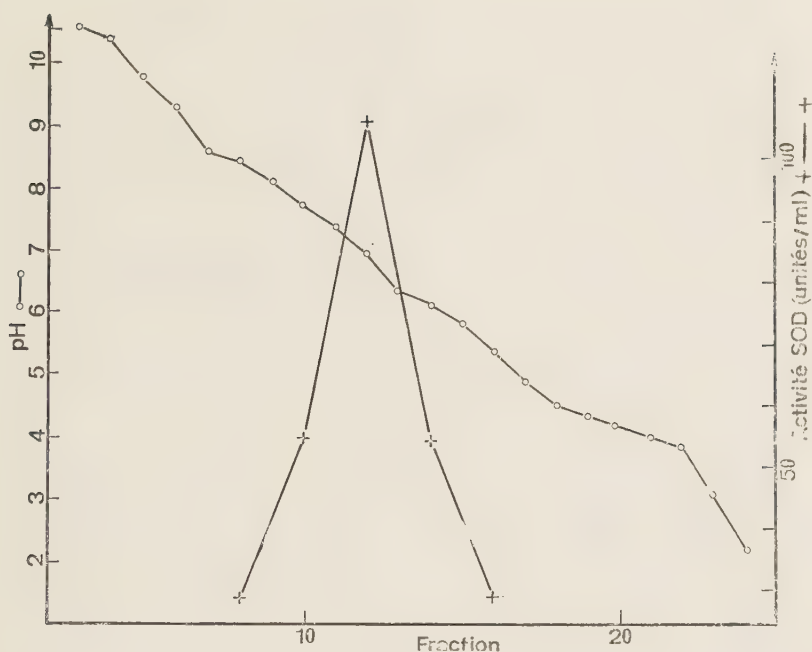


FIGURE 13

Point isoélectrique de la superoxyde dismutase SODc.

Une colonne d'électrofocalisation LKB (type 8101) est utilisée. Le dispositif contient une ampholine (pH3 - pH 10) dispersée dans un « pseudo-gradient » de saccharose obtenu par mélange séquentiel de deux solutions contenant l'une 3,1 ml d'ampholine 8 % dans 60 ml d'eau et l'autre 9,4 ml d'ampholine 8 % dans 42 ml d'eau additionnée de 28 g de saccharose ; l'enzyme après dialyse contre une solution de glycine 1 % est introduite dans une fraction médiane (85). L'anode est placée au sommet de la colonne ; une tension de 300 V est appliquée pendant 40 h, la température est maintenue à 3° C par une circulation d'alcool. Des fractions de 3 ml sont recueillies et l'activité superoxyde dismutase mesurée après neutralisation de la fraction par addition de 0,3 ml de tampon phosphate 1M pH 7.

TABLEAU IV

*Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide
en Urée 7 M de SODc et SODm.*

0,05 ml des échantillons préparés par dialyse contre l'urée 7 M sont déposés à la surface des gels de polyacrylamide contenant 7,5 % acrylamide ; l'électrophorèse est effectuée pendant 2 heures sous une intensité moyenne de 3 mA/tube dans un tampon Tris-glycine pH 8,5 ; le tampon du compartiment cathodique contient de l'urée 7 M ; les gels sont colorés par le bleu de Coomassie pendant 24 heures puis décolorés par des bains d'acide acétique à 7,5 %.

ECHANTILLON	MOBILITÉ DES BANDES		
SODc après dialyse contre Urée 7 M et avant DEAE-cellulose	0,22	—	0,39
Tube 12 (pic A) après DEAE-cellulose	0,23	—	—
Tube 17 (pic B) après DEAE-cellulose	—	—	0,38
SODm après dialyse contre Urée 7 M	—	0,35	—

TABLEAU V

Composition en acides aminés de la superoxyde dismutase SODc.

Acides aminés	Nombre de moles acides aminés/moles d'enzyme	Résidus par mole d'enzyme (intégration)
Lysine	55,33	55
Histidine	34,18	34
Arginine	12,20	12
Acide aspartique	62,01	62
Thréonine	44,39	44
Sérine	33,92	34
Acide glutamique	56,76	57
Proline	30,64	31
Glycine	52,45	52
Alanine	98,33	98
Valine	34,80	35
Méthionine	8,86	9
Isoleucine	40,72	41
Leucine	68,38	68
Tyrosine	24,38	24
Phénylalanine	24,10	24

II — PROPRIETES DUES AU METAL

1. - SPECTRES ULTRAVIOLET ET VISIBLE.

Les spectres ultraviolet et visible de la superoxyde dismutase SODc sont représentés sur la fig. 14 Dans l'ultraviolet, un spectre classique est obtenu ($E_{280}^{1\%} = 15$).

Les solutions concentrées de l'enzyme présentent une couleur rose : le spectre visible présente en effet une transition large et centrée vers 480 nm ($\epsilon_{480} = 875 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) et un épaulement plus faible situé vers 600 nm.

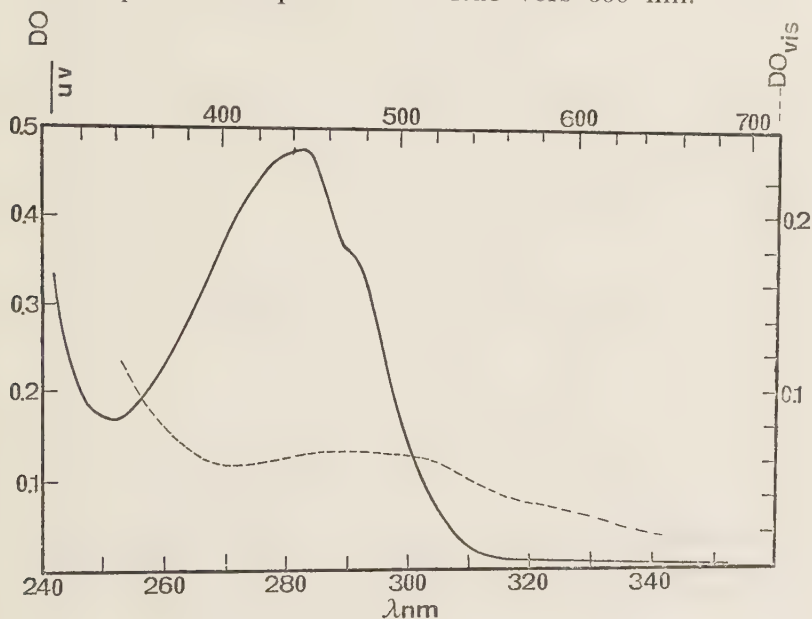


FIGURE 14

Spectres ultraviolet et visible de la superoxyde SODc dans un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7.

Les spectres sont enregistrés sur un Cary 15 Spectre U.V. (—) 0,3 mg/ml ; spectre visible (---) 6 mg/ml ; les quantités de protéine sont déterminées par la réaction de Biuret utilisant le sérum albumine bovine comme standard ; un poids moléculaire de 76 000 est utilisé pour les calculs des coefficients d'extinction moléculaires.

2. - MISE EN ÉVIDENCE DU MANGANÈSE.

A) *Absorption atomique.*

Une recherche systématique de la présence de cuivre, zinc, fer et manganèse dans les superoxyde dismutases SODc et SODm a été effectuée par la technique d'absorption atomique ; afin d'éliminer toute trace de métal non fonctionnel et contaminant, les échantillons enzymatiques ont été chromatographiés sur une petite colonne de Chelex 100 (Bio Rad Laboratories) en présence d'un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 ; il est à noter que l'enzyme retient intégralement son activité lors du passage sur ce type de résine. Le tableau VI montre qu'il existe 2 atomes de manganèse par molécule d'enzyme SODc et SODm. Alors que le zinc et le cuivre ne sont pas décelables, les préparations contiennent des traces de fer ; la présence de fer a été décelée dans toutes nos préparations mais n'a jamais excédé la valeur de 0,5 atomes/molécule d'enzyme.

B) *Utilisation du manganèse radioactif.*

Le caractère fonctionnel du manganèse, conformément au critère proposé par Vallée (86) a été mis en évidence par la purification de l'activité superoxyde dismutase isolée du champignon cultivé en présence de manganèse radioactif ; la souche *Pleurotus olearius* était cultivée sur le milieu nutritif habituel additionné de $1,4 \mu\text{Ci}$ de manganèse 54 radioactif (Commissariat à l'Energie atomique). La purification était effectuée de manière classique à partir de 50 g de mycélium humide et donne en fin d'opérations une enzyme d'activité spécifique 1 500 u/DO 280. L'enzyme est dialysée contre de grands excès de tampon phos-

TABLEAU VI

Détermination des métaux par absorption atomique.

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre d'absorption atomique Instrumentation Laboratories IL 253 ; l'étalonnage est effectué avec des solutions métalliques standard TITRISOL contenant 1 mg/l (1 ppm) de métal ; dans nos conditions expérimentales, la présence des métaux Cu, Zn, Mn, Fe n'a pas été décelée dans les tampons contenant les échantillons protéiques ; les quantités de protéine sont calculées par la réaction de Biuret et un poids moléculaire de 76 000 est utilisé pour les calculs de concentration d'enzyme.

	SODc	SODm
Quant. protéine mg/ml	0,17	0,18
Concentration protéine	$0,22 \times 10^{-5}$	$0,236 \times 10^{-5}$
Quantité Mn mg/l	0,24	0,26
Concentration Mn	$0,436 \times 10^{-5}$	$0,45 \times 10^{-5}$
Quantité Fe mg/l	0,025	0,06
Concentration Fe	$0,04 \times 10^{-5}$	$0,1 \times 10^{-5}$
Nbre d'atomes Mn/ molécules enzyme	1,98	1,9
Nbre d'atomes Fe/ molécules enzyme	0,18	0,4
Quantité Cu mg/l	0	0
Quantité Zn mg/l	0	0

phate 10^{-2} M pH 7 pendant trois jours, puis déposée sur une colonne de Chelex 100. La fig. 15 montre l'étroite corrélation existant entre l'activité enzymatique et le taux de manganèse à la sortie de la colonne.

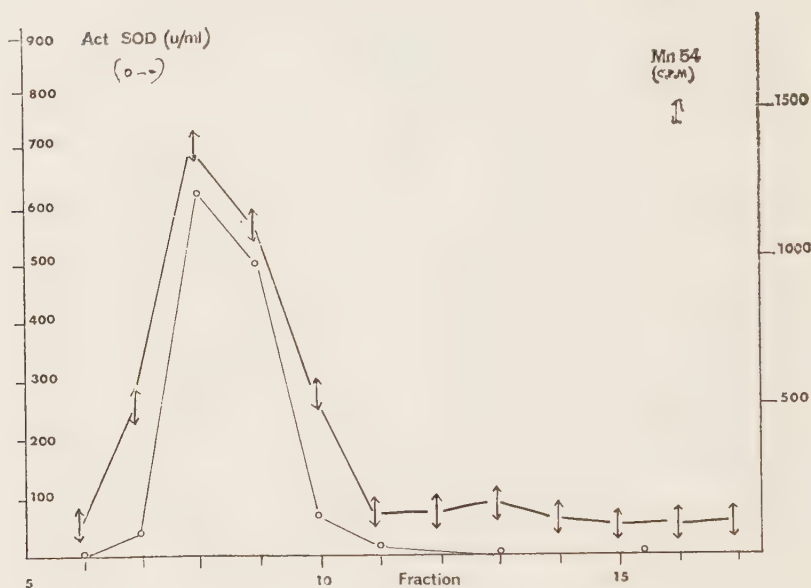


FIGURE 15

Activité enzymatique et teneur en manganèse.

Une colonne de Chelex 100 ($V = 40$ ml) est équilibrée puis éluée après dépôt de 2 ml d'enzyme radioactive par un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 ; des fractions de 2 ml sont recueillies : l'activité enzymatique est testée ; la radioactivité des échantillons est mesurée sur un compteur Nuclear Chicago. (Modèle 1042).

C) Résonance paramagnétique électronique.

La superoxyde dismutase native SODc ne donne pas de signal attribuable au manganèse en résonance paramagnétique électronique. Néanmoins, le signal caractéris-

tique du manganèse divalent apparaît quand on traite la protéine par l'acide chlorhydrique 0,1 N à 80 °C pendant 3 mn (fig. 16) ; l'intégration de ce signal après étalonnage

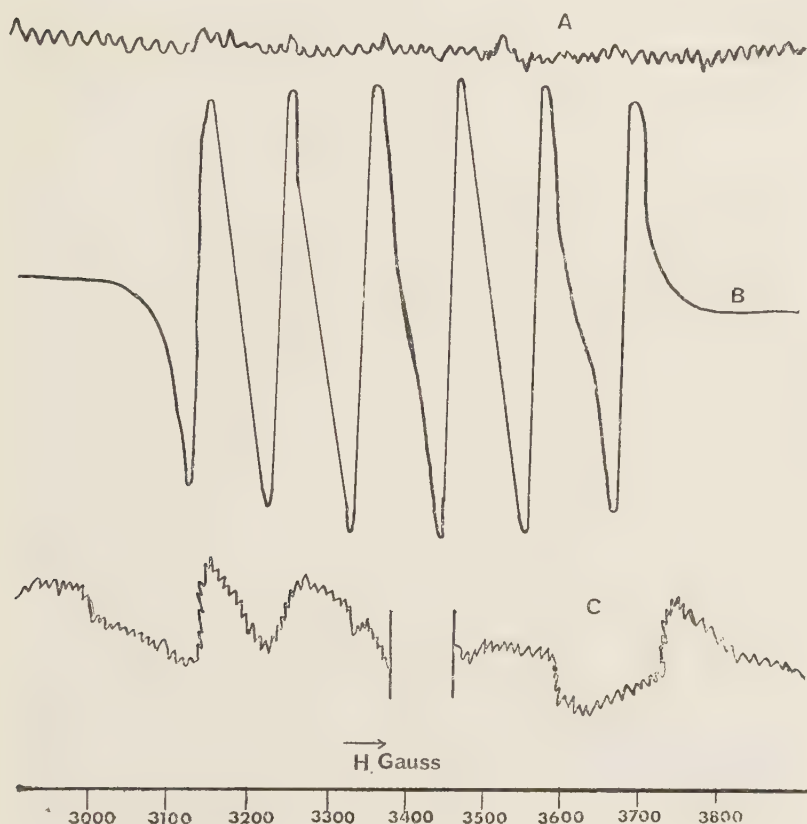


FIGURE 16

Spectre R.P.E. de la superoxyde dismutase SODc.

Les spectres sont enregistrés sur un appareil VARIAN E - 3 X (fréquence 9,52 GHz ; puissance 20 mV ; modulation d'amplitude 5 G ; gain 500 000 ; constante de temps 1 s ; température 23° C.)

A : superoxyde dismutase SODc 6 mg/ml dans un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 (gain 500 000).

B : superoxyde dismutase SODc 5,4 mg/ml dans HCl 0,1 N après chauffage à 80° C pendant 3 mn (gain 125 000).

C : superoxyde dismutase SODc 8 mg/ml dans un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 contenant $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 10^{-2} M (gain 500 000).

avec des solutions titrées de manganèse divalent libre montre l'existence de 1,75 atomes de manganèse par molécule d'enzyme, valeur concordante avec celle obtenue par spectrophotométrie d'absorption atomique.

3. - INTÉRACTION PROTÉINE-MANGANÈSE DANS LA SUPEROXYDE DISMUTASE SODc.

A) *Action des complexants.*

Les nombreux essais de préparation de l'apoenzyme par dialyse de la superoxyde dismutase SODc contre plusieurs agents complexants dont l'EDTA et les ions cyanure à différents pH se sont avérés vains : à pH neutre ou basique, aucune variation d'activité ne se produit pendant des temps très prolongés ; à pH acide (tampon acétate 5×10^{-2} M pH 5 contenant EDTA 10^{-3} M), on observe une diminution progressive d'activité (disparition totale de l'activité après 19 heures de dialyse) ; des aliquotes de l'enzyme prélevées au cours du temps et additionnées d'un excès d'ions manganeux ne présentent pas d'augmentation d'activité. Ces essais ont été répétés en présence d'oxydants (ferriocyanure de potassium) ou de réducteurs (dithionite de sodium) pouvant provoquer une déstabilisation de l'interaction ligands protéiques-manganèse par suite de la modification du degré d'oxydation du métal et se sont également révélés négatifs.

B) *Action de la guanidine 5 M et de l'urée 7 M.*

Par dialyse de l'enzyme contre ces agents, une perte d'activité très rapide se produit. Après perte d'activité, la dialyse contre des tampons aqueux pouvant éventuellement contenir du manganèse ne restaure aucune activité enzy-

matique. En utilisant l'enzyme radioactive contenant du ⁵⁴Mn nous avons pu montrer que la dialyse contre ces agents provoquait le départ du manganèse et interdisait la possibilité de relier l'association du manganèse à un type de subunité (tableau VII).

TABLEAU VII

Perte du manganèse fonctionnel par dialyse contre l'Urée 7 M et la guanidine 5 M.

Avant l'expérience, l'enzyme est chromatographiée sur une colonne de Chelex 100.

ECHANTILLON	RADIOACTIVITÉ
Enzyme native avant dialyse (V = 1 ml)	4800 c. p. m.
Enzyme dialysée 20 h contre 500 ml Urée 7 M	15 c. p. m.
Enzyme dialysée 20 h contre 500 ml guanidine 5 M	19 c. p. m.

TABLEAU VIII

Action d'oxydants et réducteurs sur l'activité de la superoxyde dicmutase SODc.

ECHANTILLON	ACTIVITÉ (u/ml)
0,3 × 10 ⁻⁵ M SODc	2000
0,3 × 10 ⁻⁵ M SODc dans 10 ⁻³ M dithionite de sodium	2000
« 10 ⁻³ M sulfate d'hydrazine	2000
« 10 ⁻³ M H ₂ O ₂	2000
« 10 ⁻³ M K ₃ Fe (CN) ₆	2000

C) *Action des oxydants et des réducteurs.*

La superoxyde dismutase est incubée dans un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 avec différents oxydants et réducteurs. Au bout de 15 mn d'incubation aucune variation d'activité enzymatique n'est décelée (tableau VIII). Les effets du dithionite de sodium et du ferricyanure de potassium sur l'absorption visible de l'enzyme sont représentés sur la fig. 17 : en présence de réducteur la bande d'absorption centrée à 480 nm disparaît, mais n'est pas affectée par l'addition de ferricyanure de potassium. Nous avons également enregistré le spectre RPE de la superoxyde dismutase SODc après réduction de l'enzyme par le dithionite de sodium (fig. 16c) ; le spectre présente plusieurs raies de résonance faibles et élargies pouvant être attribuées à du manganèse divalent ; ce spectre est de très mauvaise qualité du fait de la présence d'un signal parasite très important dû au réducteur.

III — *STABILITE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE SODc*

1. - STABILITÉ THERMIQUE.

La superoxyde dismutase SODc (1 mg/ml d'enzyme dans un tampon glycine/NaOH 10^{-2} M pH 9) est incubée à différentes températures ; au cours du temps des aliquotes sont prélevées et l'activité superoxyde dismutase mesurée. Les courbes de dénaturation thermique sont pré-

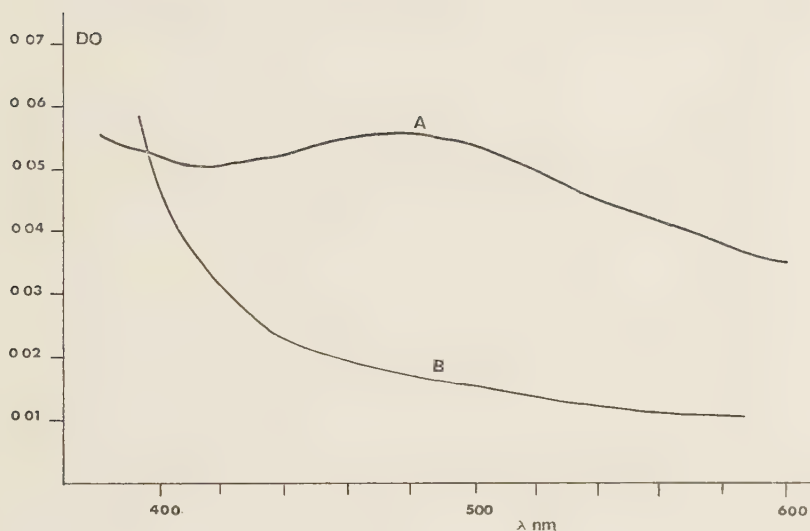


FIGURE 17

Action de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ et $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ sur la superoxyde dismutase SODc.

- A. Spectre visible de la superoxyde dismutase (5×10^{-5} M) dans un tampon phosphate 10^{-2} M pH 7. Ce spectre n'est pas modifié par addition dans la cuve de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à une concentration finale de 10^{-2} M.
- B. Spectre obtenu en présence de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ à une concentration finale de 10^{-2} M (le spectre est enregistré dans une cuve de Thunberg sous vide).

sentées sur la figure 18 et mettent en évidence une stabilité thermique importante.

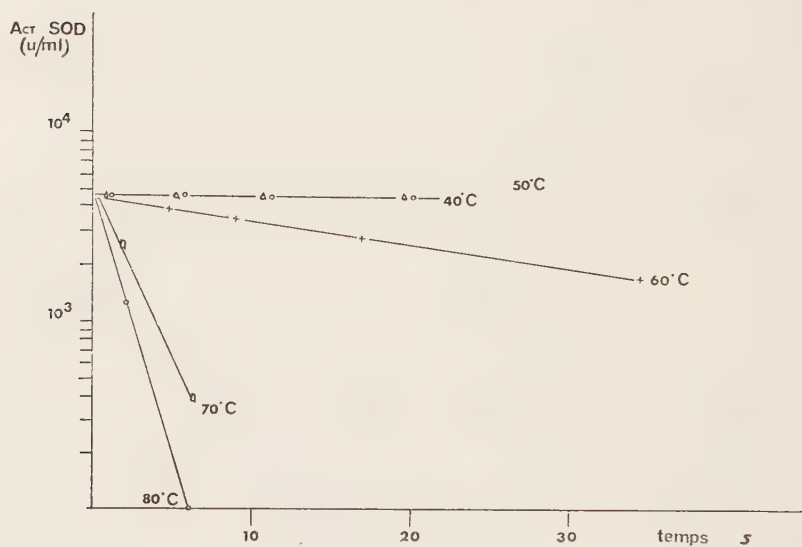


FIGURE 18

Inactivation thermique de la superoxyde dismutase SODc.

2. - STABILITÉ VIS-A-VIS DU PH.

L'incubation de la superoxyde dismutase à 20°C dans des tampons 5×10^{-2} M de pH différents (tampon phosphate pH 7 ; tampons glycine/Na OH pH 9 et pH 10 ;

tampon acétate pH 5 ; tampon citrate pH 3) a été effectuée ; au cours du temps, des prélèvements sont effectués et l'activité enzymatique mesurée dans les conditions classiques à pH 9. Les résultats sont indiqués par la figure 19 ; l'enzyme parfaitement stable aux pH alcalins, voit son activité progressivement diminuer avec le pH.

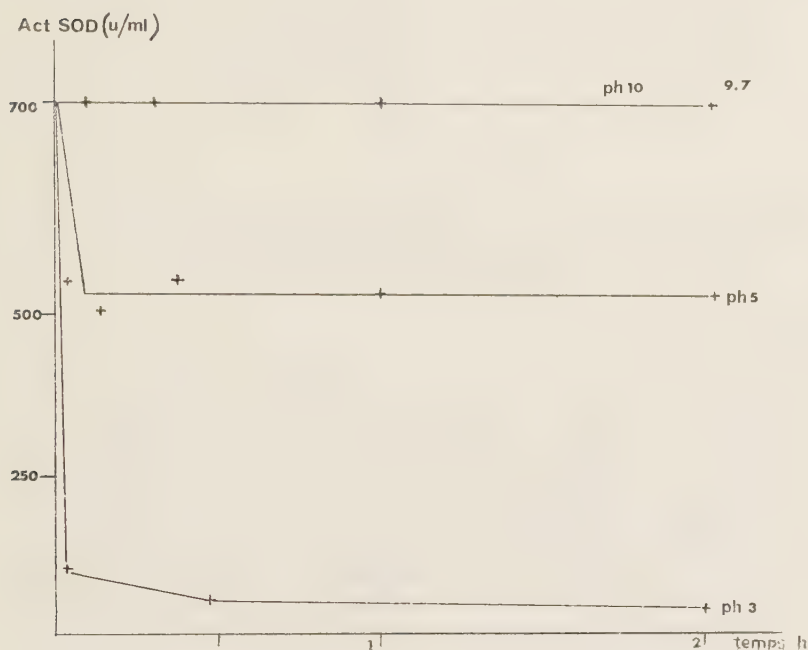


FIGURE 19

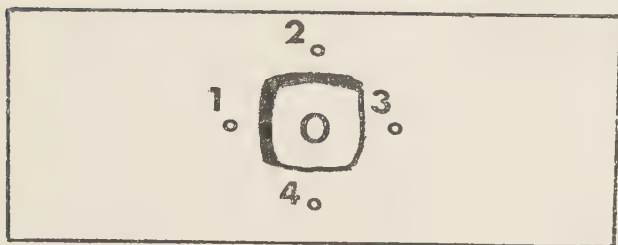
Stabilité de la superoxyde dismutase SODc vis-à-vis du pH.
 SODc (1 mg/ml) était incubée à 20° C dans différents tampons 5×10^{-2} M de pH 3 à pH 10. Des aliquotes (0,01 ml) étaient prélevées au cours du temps et dosées dans les conditions standard.

3. - ENZYMES PROTÉOLYTIQUES.

La superoxyde dismutase SOD_c est incubée avec de la trypsine ou de la chymotrypsine (Laboratoire Choay) pendant 1 h à 30°C dans un tampon phosphate 10^{-2} M pH 8 (30 : 1 poids ; superoxyde dismutase/protéase) et ne présente aucune variation d'activité ; l'intégrité de la structure étant d'autre part maintenue comme nous avons pu le vérifier par filtration sur Sephadex G-100 et électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

IV — PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DES SUPEROXYDE DISMUTASES SOD_c ET SOD_m

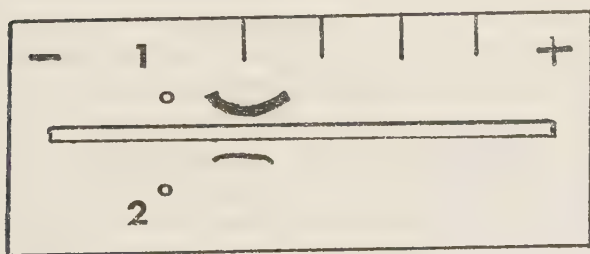
L'étude comparative des superoxyde dismutases SOD_c et SOD_m isolées à partir du champignon *Pleurotus olearius* a révélé de grandes analogies structurales (poids moléculaire, stoechiométrie en manganèse) et enzymatiques (activité spécifique similaire). Ces deux enzymes ont pu toutefois être différenciées par leurs propriétés immunologiques en utilisant un antisérum préparé contre l'enzyme SOD_c pure. Les données immunologiques sont présentées sur la figure 20. En immunodiffusion tandis qu'un arc de précipitation net et intense est obtenu au niveau des puits contenant l'antigène vrai, un arc de précipitation beaucoup plus faible et ne présentant aucun éperon avec l'arc précédent est apparent au niveau des puits contenant l'enzyme SOD_m. Cet arc peut être attribué aux traces d'antigène vrai contenu dans la fraction SOD_m et effectivement l'immunoélectrophorèse de cette fraction permet de mettre en évidence un seul arc de précipitation faible correspon-



A

FIGURE 20

A. *Immunodiffusion*. Puits central : Antisérum SODc.
Puits 1 et 2 : SODc 1 mg/ml ; Puits 3 et 4 : SODm 1,5 mg/ml.



↑
B

B. *Immunoélectrophorèse*. Puits 1 SODc 1 mg/ml ; Puits 2 SODm 1,5 mg/ml.
Les conditions techniques sont précisées dans le chapitre « Matériels et Méthodes ».

dant à l'antigène vrai, aucun arc de mobilité plus importante et pouvant correspondre à la fraction pure SODm n'étant décelable.

V — CONCLUSIONS

Deux superoxyde dismutases symbolisées SODc et SODm ont été purifiées à partir du champignon *Pleurotus olearius* et isolées dans un haut degré de pureté. Dans ce chapitre, nous avons étudié quelques propriétés structurales et fonctionnelles de ces deux enzymes.

Les superoxyde dismutases SODc et SODm ont des coefficients de sédimentation très voisins et valant respectivement 4,5 S et 4,6 S ; ces deux enzymes sont de plus éluées simultanément durant leurs filtrations sur Sephadex G-100 et donnent par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS une seule chaîne polypeptidique dont la mobilité correspond à un poids moléculaire de 20 000. Les mesures de sédimentation donnent des valeurs de poids moléculaire de 76 000 et 78 000, tandis que l'estimation de poids moléculaire par filtration sur Sephadex G-100 est de 75 000 ; malgré les approximations et limites inhérentes à ces deux méthodes indépendantes de détermination de poids moléculaire, les valeurs obtenues sont identiques et montrent clairement que ces deux superoxyde dismutases impliquent l'association de quatre chaînes polypeptidiques. La chromatographie sur DEAE-cellulose et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 7 M nous ont permis d'attribuer à ces deux enzymes des structures quaternaires distinctes : SODc contient en effet deux types de chaînes de charges distinctes, tandis que SODm ne contient qu'un seul type de chaîne, distinct des deux précédents (tableau IV). L'immu-

nologie nous a permis de différencier complètement ces deux enzymes : un antisérum préparé contre la superoxyde dismutase SODc ne donne aucun arc de précipitation visible avec l'espèce SODm révélant ainsi une absence totale de déterminants antigéniques communs ; l'implication de l'existence de ces deux enzymes sera évoquée lors de la conclusion générale de ce travail. Les deux superoxyde dismutases SODc et SODm sont des métalloprotéines contenant deux atomes de manganèse par oligomère, et, il est logique de penser que dans le cas de l'enzyme SODc, ces deux atomes sont associés à un seul type de chaîne. Bien que l'obtention d'une apoenzyme ait été impossible, la relation entre l'activité enzymatique et le taux de métal a pu être établie par passage de l'enzyme radioactive (^{54}Mn) sur une colonne de Chelex 100 et en montrant une stricte corrélation entre l'activité enzymatique et le taux de manganèse lié à la protéine à la sortie de la colonne.

Les solutions concentrées de la superoxyde dismutase SODc ont une coloration légèrement rose : le spectre visible montre l'existence d'une bande d'absorption à 480 nm ($\epsilon = 875 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) suivie d'un épaulement plus faible situé à 600 nm ; ces données rappellent celles publiées pour la superoxyde dismutase de *E. coli* qui contient un seul atome de manganèse ($\lambda_{\text{max}} 430 \text{ nm}$ $\epsilon = 400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (34) ; un spectre similaire a été également décrit pour une protéine à manganèse, l'avimanganine de poids moléculaire 89 000 contenant un atome de manganèse et dépourvue d'activité enzymatique, isolée des mitochondries de foie de poussin (87) ; un travail récent suggère d'ailleurs que cette protéine correspondrait à une superoxyde dismutase inactivée pendant la purification (37). Nous avons montré que la transition à 480 nm disparaissait par action d'un réducteur comme le dithionite de sodium, mais n'était pas modifiée par action d'un oxydant comme le ferricyanure de potassium ; l'addition de ces réactifs ne modifie pas l'ac-

tivité de l'enzyme. D'autre part, la protéine native ne donne pas de signal RPE attribuable au manganèse, le spectre caractéristique du métal n'apparaissant qu'après libération du manganèse de l'enzyme ; malgré sa mauvaise qualité, le spectre RPE de l'enzyme réduite présente une série de raies élargies d'intensité faible, attribuable à du manganèse bivalent lié à l'enzyme.

Ces résultats nous conduisent à proposer que le manganèse se trouve à l'état trivalent Mn^{III} dans l'enzyme au repos. Cette hypothèse est bien corroborée par les données spectrales des complexes modèles de manganèse (88) (89) et également par les études de résonance paramagnétique électronique de protéines comme la pyruvate carboxylase et la concanavaline qui contiennent du manganèse bivalent lié (90) (91) (92) ; nous exposerons brièvement les principaux résultats de ces travaux. Les complexes octaédriques et tétraédriques du manganèse divalent comme $Mn(H_2O)_6^{2+}$ et $MnBr_4^{2-}$ présentent des bandes d'absorption multiples à 350, 500 et 600 nm de coefficients d'extinction moléculaire faibles ($\leq 0,4 M^{-1} cm^{-1}$). Les données optiques de ces complexes modèles rendent compte du manque d'absorption visible des manganoprotéines ; ces protéines donnent un signal RPE traduisant les propriétés paramagnétiques de l'ion Mn^{II} : l'amplitude du signal RPE du manganèse lié à ces protéines est très fortement diminuée par rapport à celle du signal du manganèse libre : ceci a été attribué à une restriction de la liberté de mouvement de l'ion métallique central fortement lié à ses ligands protéiques (92). Ces données s'accordent bien avec le spectre RPE de l'enzyme réduite. Les complexes du manganèse trivalent sont beaucoup plus difficiles à obtenir du fait de la configuration $3d^4$ des électrons de transition très favorable à l'établissement de réactions d'oxydo-réduction. Des complexes comme $Mn(CN_6)^{3-}$, où les quatre électrons de la sous-couche $3d$ de ce métal de transition confèrent à l'atome métallique central un état de bas spin d'après la

théorie électrostatique du champ de ligand, ont été préparés mais ne donnent aucune absorption visible mesurable. Une classe de complexes octaédriques du manganèse trivalent où le métal se trouve dans un état de haut spin et comporte trois molécules de ligands bicoordinnés comme le manganitrioxalate de potassium $K_3 [Mn (C_2O_4)_3]$ ou le manganitridiéthylthiocarbamate $Mn[(C_2H_5)_2N-CS_2]_3$ présente des propriétés optiques voisines de nos données : ces complexes qui mettent en jeu des groupements fonctionnels présents dans les protéines possèdent des bandes d'absorption à 480 ou 500 nm avec des coefficients d'extinction moléculaire de l'ordre de 200 à 300 $M^{-1} cm^{-1}$. Les études spectrales et magnétiques de la superoxyde dismutase et les comparaisons avec les différentes classes de complexes du manganèse semblent indiquer que dans la superoxyde dismutase SODc, le manganèse se trouve dans un état trivalent de haut spin et forme un complexe octaédrique avec ses ligands protéiques ; le spectre RPE de l'enzyme réduite montre de plus la forte association du métal avec la protéine qui peut expliquer les difficultés de préparation de l'apoenzyme.

CHAPITRE III

PROPRIÉTÉS CINÉTIQUES

TABLEAU IX

Activités spécifiques de la superoxyde dismutase SODc et de l'érythrocupréine humaine.

L'activité enzymatique est mesurée dans les conditions standards (système enzymatique de la xanthine oxydase à pH 9) ; l'érythrocupréine humaine pure utilisée pour ces expériences a été préparée selon la technique classique de McCord (11).

Enzyme	Protéine mg/ml	Concentration	Act/ml	Act/moles	Act/mg
Erythrocupréine humaine	1	$2,95 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^4$	$0,9 \times 10^9$	27 000
SODc	5,25	7×10^{-5}	$1,37 \times 10^4$	$0,19 \times 10^9$	2 600

I — COMPARAISON DES ACTIVITES DE L'ÉRYTHRO- CUPREINE ET DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE SODc

1. - INHIBITION DE LA RÉACTION DE CHIMILUMINESCENCE DU LUMINOL.

Des préparations pures d'érythrocupreine humaine ou bovine préparées selon la technique de McCord et Fridovitch (11) et de superoxyde dismutase SODc inhibent la réaction de chimiluminescence du luminol provoquée par le système enzymatique hypoxanthine/xanthine oxydase/oxygène (voir fig. 2 et 3 pp. 38-40). Toutefois, ces deux enzymes présentent des activités spécifiques nettement différentes (tableau IX) ; dans ce système l'érythrocupreine humaine est cinq fois plus active que la superoxyde dismutase SODc.

2. - RÉACTION DE COMPÉTITION AVEC LE FERRICYTOCHROME C.

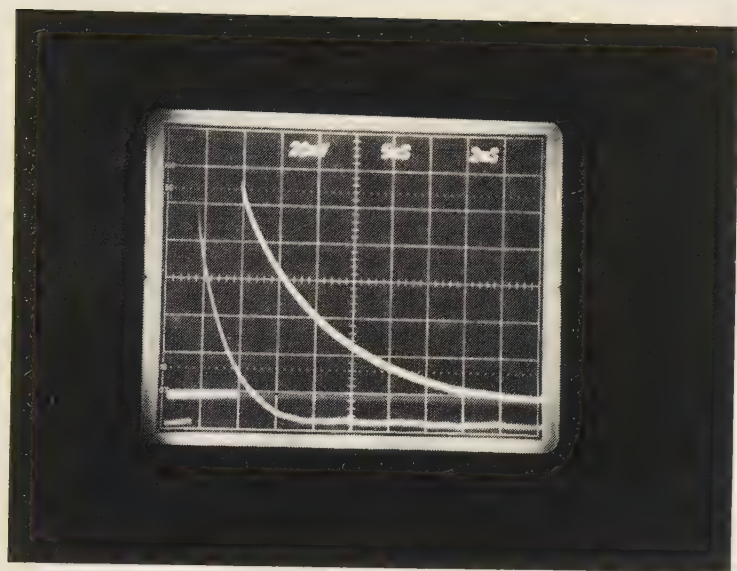
Ces deux enzymes inhibent la réduction du ferricytochrome c suivie à 550 nm, produite par addition de 0,03 ml

de xanthine oxydase 3×10^{-7} M à un mélange hypoxanthine 5×10^{-5} M, cytochrome c $0,9 \times 10^{-3}$ M, EDTA 10^{-4} M, tampon glycine NaOH 5×10^{-2} M pH 9 ($V = 3$ ml). Les concentrations d'enzymes requises pour obtenir une diminution moitié de la vitesse de réduction sont de $0,45 \times 10^{-9}$ M pour l'érythrocupréine et de $0,32 \times 10^{-8}$ M pour la superoxyde dismutase SODc. Avec ce nouvel accepteur d'ion superoxyde, l'érythrocupréine apparaît tout comme précédemment plus active que la superoxyde dismutase SODc.

II — MESURE DE L'ACTIVITE DE L'ENZYME PAR RADIOLYSE PAR ELECTRONS ACCELERES

1. - ACTIVITÉ DE L'ENZYME ET ROLE DU pH.

Les méthodes indirectes de compétition ayant révélé des différences de réactivité entre l'érythrocupréine et la superoxyde dismutase SODc, nous avons étudié l'activité de cette enzyme par la méthode directe de radiolyse par électrons accélérés : cette technique produit d'une part de hautes concentrations de substrat et permet d'autre part grâce aux très faibles temps de résolution ($< 0,1$ ms) de suivre la disparition de l'ion superoxyde à 250 nm. Une expérience typique de disparition catalytique de l'ion superoxyde par la superoxyde dismutase SODc est représentée sur la photographie 2. Connaissant le pourcentage de transmission, la concentration d'ion superoxyde peut être calculée à chaque instant en utilisant un coefficient d'extinction moléculaire de $2\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (62) ; la représentation semilogarithmique de diminution de densité optique à



PHOTOGRAPHIE II

Action catalytique de la superoxyde dismutase SODc :

Courbe supérieure : Variation de la transmission à 250 nm en fonction du temps (2 ms); courbe inférieure : Variation de la transmission à 250 nm en fonction du temps (5ms); un carreau de l'échelle des ordonnées représente une variation de transmission de 2 %.

La cuve contient : superoxyde dismutase SODc $0,7 \times 10^{-6}$ M, formiate de sodium 0,1 M, EDTA 10^{-4} M, tampon phosphate pH 6,35 2×10^{-3} M, (volume final 2 ml); la concentration initiale d'ion superoxyde est égale à $3,7 \times 10^{-5}$ M.

250 mn en fonction du temps est une droite (fig. 21) ; la réaction de dismutation de l'ion superoxyde catalysée par la superoxyde dismutase est ainsi un processus d'ordre 1, soit :

$$-\frac{d(O_2^{\cdot -})}{dt} = k (O_2^{\cdot -}) \text{ (SOD)}$$

en posant $K = k \text{ (SOD)}$ on obtient $(O_2^{\cdot -})_t = (O_2^{\cdot -})_0 e^{-Kt}$

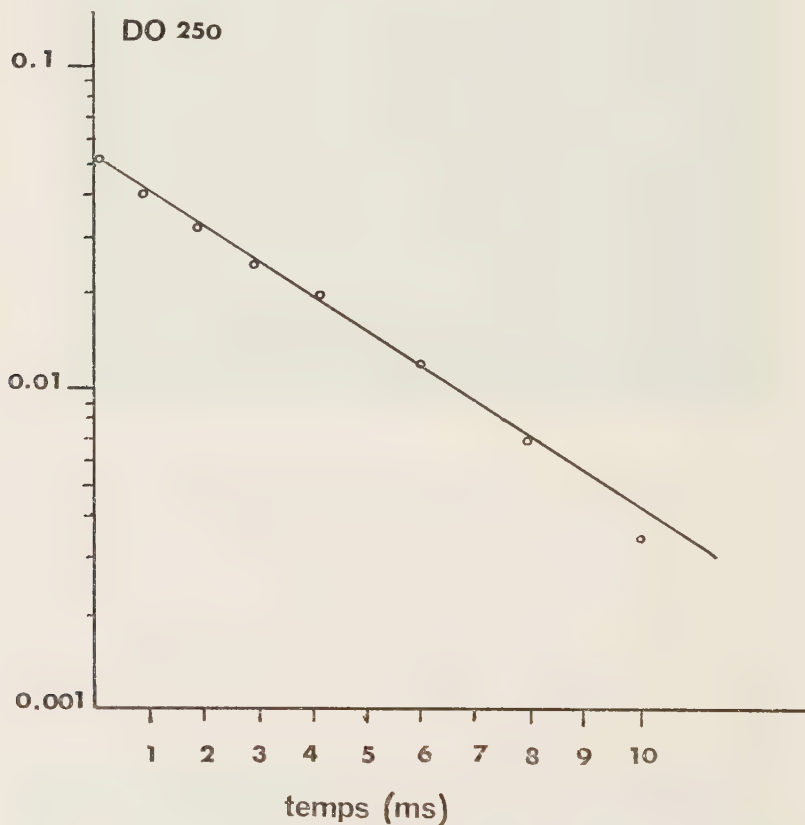


FIGURE 21

Représentation semi-logarithmique de la disparition catalytique de l'ion superoxyde.

Les données expérimentales sont identiques à celles indiquées par la légende de la Photographie 2.

La répétition de « pulses » successifs (≤ 10) ne provoque aucune diminution d'activité enzymatique : ainsi, aucune inactivation de l'enzyme n'a lieu soit par action directe du « pulse » d'électrons, soit par réaction photochimique provoquée par la lumière très puissante de la lampe d'analyse, soit enfin par accumulation successive d'eau oxygénée qui est un des produits finaux de la réaction

Nous avons vérifié que la vitesse de réaction était proportionnelle à la quantité d'enzyme présente : à pH 6,35, le temps de demi-réaction est de 2,7 ms pour une concentration de superoxyde dismutase égale à $0,7 \times 10^{-6}$ M ; il n'est plus que de 0,56 ms quand la concentration d'enzyme passe à $3,5 \times 10^{-6}$ M. Le chauffage de l'enzyme (2 mn à 100°C) abolit toute activité enzymatique et la courbe de décroissance de l'ion superoxyde se superpose à la courbe de décroissance spontanée. Nous avons ensuite mesuré l'activité de l'enzyme en fonction du pH ; la solution est composée de :

Formiate de sodium	0,1 M
EDTA	10^{-4} M
Tampon phosphate	2×10^{-3} M (pH 6 — pH 10,2)
SODc	$3,3 \times 10^{-6}$ M

Les réactions de décomposition d' O_2^- sont dans tous les cas des réactions d'ordre 1 analogues à celle décrite précédemment. A chaque pH la constante k peut être calculée en divisant K déterminé graphiquement par la concentration d'enzyme. Le tableau X donne les valeurs de k en fonction du PH.

2. - REPRÉSENTATION DE LINEWEAVER-BURKE.

En faisant varier la concentration en ion superoxyde de 10^{-5} à $1,6 \times 10^{-4}$ M nous avons essayé de déterminer le

TABLEAU X

Variations de la constante de vitesse k en fonction du pH.

La concentration d'enzyme est égale à $3,3 \times 10^{-6}$ M ; la concentration initiale d'ion superoxyde vaut $3,9 \times 10^{-5}$ M.

pH	6	7	7,85	9,1	10,2
t 1/2 réaction (ms)	0,56	0,7	0,575	0,52	0,53
k ($M^{-1} s^{-1}$)	$3,7 \times 10^8$	3×10^8	$3,6 \times 10^8$	4×10^8	4×10^8

TABLEAU XI

Variations de $\frac{1}{V}$ en fonction de $\frac{1}{O_2}$.

La concentration d'enzyme est de $0,5 \times 10^{-6}$ M ; la solution est composée par : formiate de sodium 0,1 M, EDTA 10^{-4} M, tampon phosphate 2×10^{-3} M pH 6,1.

$\frac{1}{O_2}$ mM ⁻¹	99	63	46	16,7	6
$\frac{1}{V}$ ms mM ⁻¹	412	291	212	65	16

Km de l'enzyme ; la solution étant constituée par : formiate de sodium 0,1 M, EDTA 10^{-4} M, tampon phosphate 2×10^{-3} M pH 6,1, superoxyde dismutase SODc $0,5 \times 10^{-6}$ M.

Les valeurs obtenues sont indiquées dans le tableau XI et la représentation de Lineweaver-Burke $\frac{1}{V} = f\left(\frac{1}{S}\right)$ est tracée sur la figure 22. On voit que dans ce domaine de concentration aucun phénomène de saturation de l'enzyme n'apparaît.

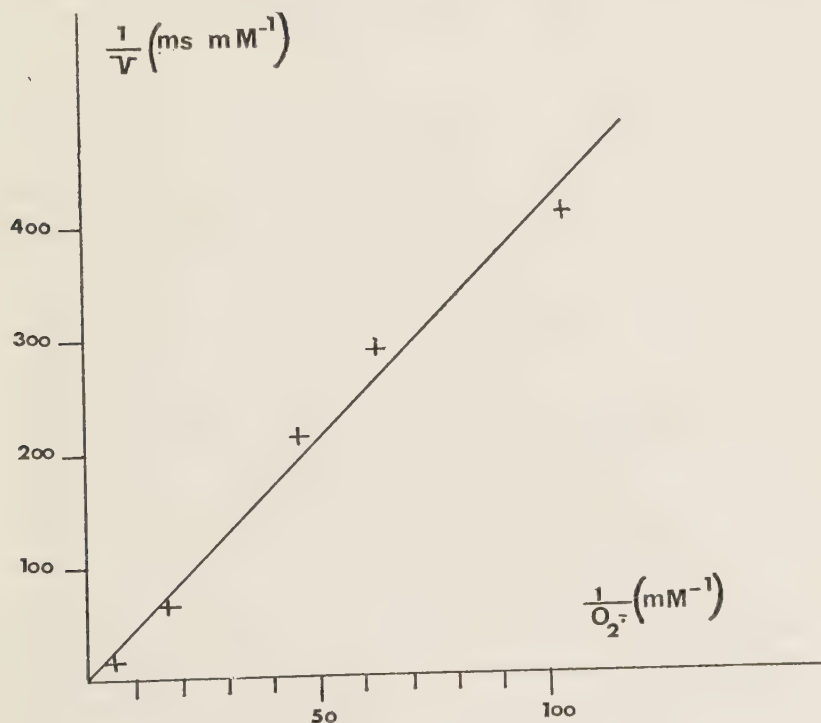


FIGURE 22

Représentation de Lineweaver Burke pour la superoxyde dismutase SODc. Les valeurs et conditions expérimentales sont précisées dans la légende du Tableau XI.

III — CONCLUSIONS

La superoxyde dismutase SODc présente deux caractéristiques cinétiques insolites : d'une part, la constante de vitesse k est indépendante du pH et vaut approximativement $3,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; d'autre part, l'enzyme ne peut être saturée comme en témoigne la représentation de Lineweaver-Burke qui est une droite passant par l'origine. Ces deux caractéristiques se retrouvent dans le cas des érythrocypréines humaine et bovine où la constante de vitesse k est plus élevée et vaut $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (58) (59) (60). Le simple examen de ces constantes de vitesse permet de rendre compte de l'activité plus importante de l'érythrocypréine dans les méthodes de compétition utilisant le luminol ou le ferriocytochrome c. Les valeurs des constantes de vitesse k des superoxyde dismutases sont exceptionnellement élevées et s'approchent des limites théoriques des vitesses de diffusion entre une enzyme et un substrat qui sont de l'ordre de 10^{10} à $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (93). Dans de telles conditions proches de la diffusion, le manque de saturation d'une enzyme par son substrat n'est pas surprenant. La valeur de k permet également d'expliquer l'indépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis du pH : Eigen et Hammes ont montré qu'un effet de pH impliquant un processus acido-basique dans la catalyse enzymatique ne pouvait être observé que pour des enzymes de « turn-over » maximal 10^8 s^{-1} . Bien qu'il soit impossible de calculer la valeur du « turn-over » de la superoxyde dismutase SODc, une valeur minimale peut être estimée à $6,8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ et dans ces conditions il n'est pas étonnant d'observer aucun effet du pH sur l'activité enzymatique tout comme dans le cas de la catalase qui possède elle aussi un « turn-over » exceptionnellement haut (93) (94).

CHAPITRE IV

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Nous avons abordé l'étude de la fonction biologique des superoxyde dismutases en examinant l'inactivation de systèmes biologiques placés dans des conditions où il y a une production exogène importante d'ion superoxyde et en essayant de mettre en évidence le rôle protecteur de la superoxyde dismutase.

Les conditions expérimentales de production d'ions superoxyde par la réaction de photoréduction des flavines ou par le système enzymatique hypoxanthine/xanthine oxydase/oxygène, ainsi que les techniques de comptage des micro-organismes ont été décrites dans le chapitre « Matériels et Méthodes ».

I — SYSTEME BACTERIEN

Une culture de la bactérie marine *Photobacterium leiognathi* en phase exponentielle ($V = 100$ ml ; 10^8 cellules/ml) est centrifugée à 10 000 t/mn (ROTOR GS-A) pendant 30 mn ; le culot bactérien est dispersé dans 100 ml de sérum physiologique, puis cette suspension est diluée

dix fois dans une solution composée de FMN 5×10^{-5} M et de NaCl 3 % (volume final = 10 ml). Les échantillons sont irradiés à 365 nm par une lampe B 100 A sous agitation constante à 25°C. Au cours du temps, des aliquotes sont prélevées et les cellules comptées. La figure 23 montre la courbe de survie de la bactérie et révèle une diminution de mortalité obtenue en présence de superoxyde dismutase SODc.

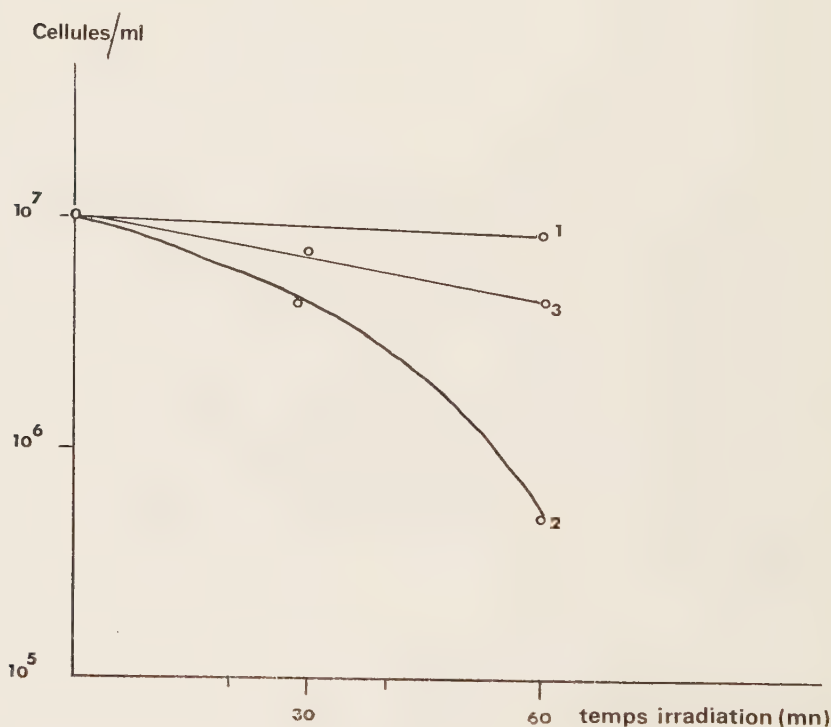


FIGURE 23

Courbe de survie de la bactérie *Photobacterium leiognathi* vis-à-vis d' O_2^- produit photochimiquement.

- 1) Bactéries non irradiées et gardées à l'obscurité.
- 2) Bactéries irradiées.
- 3) Bactéries irradiées en présence de superoxyde dismutase SODc (13,5 unités/ml).

Au cours de ce genre d'expérience, nous avons également constaté que la superoxyde dismutase protégeait la bactérie contre l'irradiation à 365 nm en l'absence de flavine exogène : une suspension de bactérie *Photobacterium leiognathi* dans le sérum physiologique, irradié à 20°C pendant seize heures décroît de $9,7 \times 10^4$ cellules/ml à $1,5 \times 10^2$ cellules/ml, tandis qu'en présence de 53 u/ml de superoxyde dismutase SODc il reste encore $3,3 \times 10^2$ cellules/ml.

II — SYSTEME DU BACTERIOPHAGE R_{17}

1. - INCUBATION AVEC $O_2^{\cdot -}$ PHOTOCHIMIQUE.

Une suspension du bactériophage R_{17} est diluée dix fois dans une solution contenant FMN 10^{-4} M, EDTA 10^{-3} M, tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 (volume final 0,8 ml). La photoréduction est effectuée au spectrofluorimètre Zeiss. Le tableau XIIa présente les résultats obtenus : le taux

TABLEAU XIIa

Diminution du taux d'infection du phage R 17 par $O_2^{\cdot -}$ produit photochimiquement et protection par la superoxyde dismutase.

L'essai contient 13,5 u/ml de superoxyde dismutase SODc. Le témoin est effectué en présence d'une quantité équivalente de superoxyde dismutase inactivée préalablement par passage à pH 3 pendant 5 mn.

Nombre de cycles de photoréduction	Témoin phages/ml	Essai phages/ml
0	$4,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$
3	$4,9 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$
6	5×10^6	$1,5 \times 10^7$
9	5×10^5	2×10^6

d'infection du phage diminue en fonction de la quantité croissante d'ion superoxyde obtenu par des cycles d'oxydo-réduction successifs et la présence de superoxyde dismutase offre une protection sensible.

2. - INCUBATION AVEC LE SYSTÈME HYPOXANTHINE/XANTHINE OXYDASE/OXYGÈNE.

L'inactivation du bactériophage R₁₇ qui a lieu rapidement en présence d'O₂⁻ photochimique, peut également être provoquée par l'ion superoxyde produit en quantités plus faibles par le simple système enzymatique hypoxanthine/xanthine oxydase/oxygène : 0,3 ml d'une suspension de bactériophages est diluée 10 fois dans le mélange réactionnel enzymatique qui peut être rechargé par addition de 0,05 ml de xanthine oxydase et 0,3 ml d'hypoxanthine 10⁻³ M au bout de 15 mn. Le tableau XIIb montre l'inactivation progressive du bactériophage par l'ion superoxyde produit enzymatiquement ; la superoxyde dismutase à concentration élevée confère une bonne protection.

TABLEAU XIIb

Diminution du taux d'infection du phage R 17 par le système enzymatique hypoxanthine/xanthine oxydase/oxygène et protection par la superoxyde dismutase.

L'essai contient 200 u/ml de superoxyde dismutase SODc, le témoin est effectué en présence d'une quantité équivalente de superoxyde dismutase inactivée préalablement par passage à pH 3 pendant 5 mn.

Nombre de cycles enzymatiques	Témoin phages/ml	Essai phages/ml
0	5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸
1	3,5 × 10 ⁸	5 × 10 ⁸
2	2 × 10 ⁸	4 × 10 ⁸

III — SYSTEME ENZYMATIQUE : LA RIBONUCLEASE PANCREATIQUE

L'ion superoxyde produit par oxydation des flavines photoréduites inactive de manière très significative la ribonucléase pancréatique, enzyme réputée d'une grande stabilité. La superoxyde dismutase une fois encore protège avec efficacité la ribonucléase contre cette perte d'activité.

Le tableau XIII et la figure 24 présentent les résultats

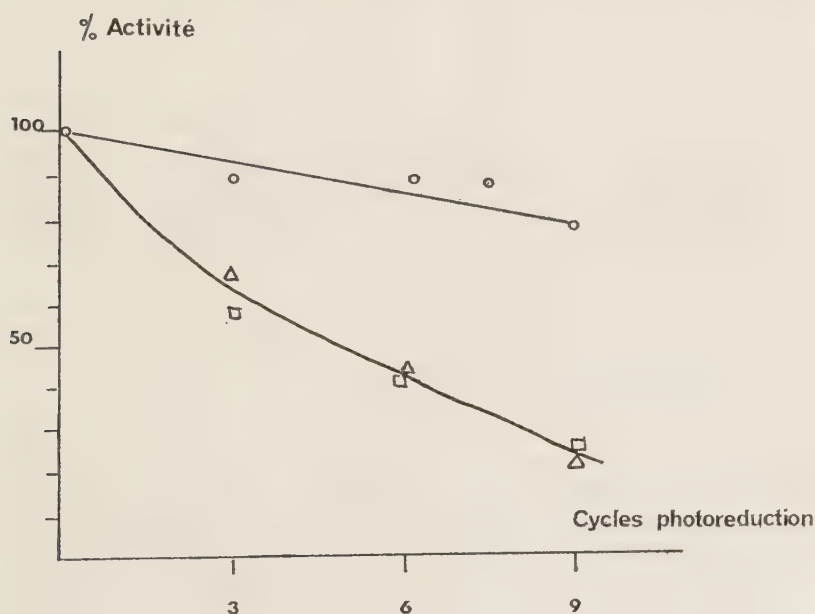


FIGURE 24

Courbe d'inactivation de la ribonucléase pancréatique vis-à-vis d' O_2^- produit photochimiquement.

Δ ribonucléase ; $\square$ ribonucléase + superoxyde dismutase SODc dénaturée par passage à pH 3 ; $\circ$ ribonucléase + superoxyde dismutase SODc 67,5 u/ml.

TABLEAU XIII

Inactivation de la ribonucléase par O_2^- produit photochimiquement et protection par la superoxyde dismutase.

Le témoin est effectué en présence d'une quantité équivalente de superoxyde dismutase SODc inactivée préalablement par passage à pH 3 pendant 5 mn.

Nombre cycles de Photoréduction	% Activité résiduelle		
	RNAse	+ SODc dénaturée	+ SODc 67,5 u/ml
0	100	100	100
3	67	56	89
6	45	45	89
9	22	22	67

obtenus sur une solution de ribonucléase (0,01 mg/ml) dans FMN 10^{-4} M, EDTA 10^{-2} M, tampon phosphate 10^{-2} M pH 7 irradiée dans un spectrofluorimètre Zeiss.

IV — DISCUSSION

Ces expériences font apparaître la réactivité et la toxicité de l'ion superoxyde vis-à-vis de macromolécules biologiques et microorganismes et mettent en évidence la protection offerte par la superoxyde dismutase. L'ion superoxyde présente un temps de vie beaucoup plus long que celui d'autres espèces radicalaires dérivées de l'oxygène et peut ainsi réagir pendant des temps et à des distances relativement importantes. Nos expériences avec le système bactérien montrent que l'ion superoxyde peut diffuser à travers la membrane bactérienne et provoquer de graves altérations au niveau notamment du génôme cellulaire

quand sa concentration intracellulaire devient trop importante pour permettre une destruction rapide et totale par les enzymes endogènes : dans nos expériences, la concentration d'ion superoxyde produit par photo-réduction des flavines et qui peut être estimée par la quantité de lumière émise en présence de luminol est 10^4 fois plus importante que la concentration d'ion superoxyde produite dans des conditions plus physiologiques par le système enzymatique hypoxanthine/xanthine oxydase/oxygène et qui est de 10^{-10} M (67) ; la réactivité de l'ion superoxyde sur le DNA est corroborée par le fait que la xanthine oxydase peut oxyder les bases puriques (95). Dans le cas du bactériophage R₁₇ qui ne possède pas d'enzyme de protection et dont le RNA est plus facilement accessible, le dommage provoqué par l'ion superoxyde est plus intense et, en fait, les faibles concentrations d'ion superoxyde engendrées par le système hypoxanthine/xanthine oxydase/oxygène suffisent à diminuer sensiblement le taux d'infection du virus. La ribonucléase exposée à un flux d'ions superoxyde perd progressivement son activité enzymatique et l'addition de superoxyde dismutase confère au système une résistance accrue ; plusieurs auteurs ont montré que l'ion superoxyde pouvait oxyder les groupements thiols et les résidus tryptophane (96) (97). En collaboration avec d'autres chercheurs, nous avons pu montrer que l'ion superoxyde était impliqué dans des réactions d'autooxydation des lipides et que l'addition de superoxyde dismutase offrait une protection substantielle (98) ; la lysine tRNA ligase de *Saccharomyces Cerevisiae* est une lipoprotéine dont l'intégrité de la fraction lipidique est nécessaire à l'expression de l'activité ; par suite de l'autooxydation de la fraction lipidique, l'enzyme purifiée perd progressivement son activité. Cette réaction est vraisemblablement provoquée par une série de réactions d'oxydoréduction entre l'oxygène et des traces métalliques présentes dans la solution ; cette inactivation est considérablement freinée en présence de superoxyde

dismutase. La toxicité de l'ion superoxyde peut être amplifiée par des réactions secondaires du type :



conduisant à la formation de radicaux hydroxyle très réactifs et dangereux pour les cellules (27). Une telle réaction doit être inhibée simultanément par la superoxyde dismutase et la catalase : ainsi, dans certaines expériences malheureusement peu reproductibles, nous avons observé une protection accrue en présence de ces deux enzymes.

Ces expériences montrent que les différents constituants cellulaires (acides nucléiques protéines, lipides) sont attaqués facilement par l'ion superoxyde et la fonction biologique de la superoxyde dismutase apparaît capitale, puisque cette enzyme peut protéger très efficacement les composants cellulaires vis-à-vis de l'ion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot -}$ produit au cours du métabolisme ou d'origine exogène.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Deux superoxyde dismutases SODc et SODm sont présentes dans le champignon *Pleurotus olearius*. Ces deux enzymes présentent des activités spécifiques comparables ; l'enzyme SODc est la plus abondante et rend compte approximativement des deux tiers de l'activité totale. Les résultats concernant la purification et les propriétés structurales de ces deux enzymes sont présentés et discutés dans les chapitres I et II. Nous rappellerons que l'enzyme SODc a un poids moléculaire de 75 000, contient deux atomes de manganèse, est constituée de deux types de subunités de même poids moléculaire (20 000) mais séparables par chromatographie sur DEAE-cellulose en présence d'urée 7 M. L'enzyme SODm présente un poids moléculaire et un taux de manganèse identiques à ceux de l'enzyme SODc mais ne contient toutefois qu'un seul type de subunité (poids moléculaire 20 000). Ces deux enzymes, malgré leurs analogies structurales et enzymatiques, sont très différentes immunologiquement : un antisérum préparé contre l'espèce SODc ne donne aucune réaction avec l'espèce SODm. L'enzyme principale SODc diffère évidemment de toutes les superoxyde dismutases à cuivre isolées jusqu'à maintenant à partir de différentes cellules Eucaryotes telles les érythrocytes de mammifères (11) (48), *Neurospora crassa*

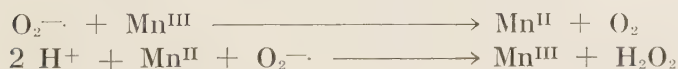
(35), le germe de blé (36), les petits pois (38), *Saccharomyces cerevisiae* (39) ; elle diffère également des superoxyde dismutases à manganèse de *E. coli* (34) et de mitochondries de foie de poussin (37). L'enzyme secondaire SODm présente par contre une structure rappelant celle de cette enzyme mitochondriale qui a un poids moléculaire de 78 000, est constituée de 4 subunités identiques (20 000) et contient 2,3 atomes de manganèse.

Nous proposons que la superoxyde dismutase principale SODc correspond à la superoxyde dismutase cytoplasmique du champignon *Pleurotus olearius*. La deuxième enzyme SODm pourrait représenter la superoxyde dismutase mitochondriale du champignon en raison de ses analogies structurales avec l'enzyme mitochondriale de foie de poussins.

L'obtention pour la première fois d'une superoxyde dismutase cytoplasmique à manganèse chez un Eucaryote contredit l'hypothèse de Fridovich et de ses collaborateurs qui ont affirmé que les propriétés de l'enzyme cytoplasmique avaient été rigoureusement conservées durant l'évolution des Eucaryotes et que toutes les cellules Eucaryotes contiendraient une superoxyde dismutase à cuivre de propriétés similaires à l'érythrocypréine, tandis que les cellules Procaryotes posséderaient une enzyme à manganèse analogue à celle isolée à partir de *E. coli* (21). Les propriétés de l'enzyme SODc suggèrent que dans quelques branches de l'évolution aérobie, les superoxyde dismutases de certains Eucaryotes et Procaryotes ont une origine commune. Cette observation a été confirmée par la purification récente au Laboratoire d'une superoxyde dismutase à cuivre chez un Procaryote la bactérie *Photobacterium leiognathi* (99).

Nous avons étudié les propriétés cinétiques de la superoxyde dismutase SODc par la technique de radiolyse par électrons accélérés qui s'avère nécessaire d'une part pour obtenir des quantités très importantes d'ion superoxyde et qui est d'autre part la seule technique ayant un pou-

voir de résolution adéquat du fait de l'échelle de temps extrêmement brève des phénomènes. Tandis que les réactions de dismutation spontanée du substrat $O_2^{\cdot-}$ sont des réactions d'ordre 2 dont la constante de vitesse dépend fortement du pH (62), la réaction de dismutation catalysée par la superoxyde dismutase SODc est une réaction d'ordre 1 dont la constante de vitesse est indépendante du pH et vaut approximativement $3,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Comme nous l'avons discuté dans le chapitre III, cette valeur est extrêmement élevée et explique cette indépendance à l'égard du pH et également l'impossibilité de définir un K_m . Ne disposant pas de quantités suffisantes d'enzyme, il nous a été impossible de reproduire ce type d'expérience en suivant les variations d'absorption du manganèse à 480 nm et de proposer un mécanisme réactionnel comme cela a été fait pour l'érythrocypréine bovine (66) (100). Nous avons toutefois montré que le manganèse trivalent Mn^{III} qui confère à l'enzyme native une coloration rose (λ_{max} 480 nm $\epsilon = 875 \text{ M}^{-1}$) pouvait être réduit sous forme de manganèse divalent Mn^{II} par l'action de réducteurs; l'enzyme réduite possède la même activité que l'enzyme native vis-à-vis d' $O_2^{\cdot-}$ dans les tests de compétition avec le luminol. Il est donc vraisemblable qu'au cours du cycle catalytique l'enzyme subit une série de réactions d'oxydo-réduction du type :



L'activité très importante de la superoxyde dismutase prend toute sa signification quand on envisage la fonction biologique de cette enzyme (chapitre IV). Nous avons montré que l'ion superoxyde produit par des réactions biologiques comme l'oxydo-réduction des flavines ou le système enzymatique de la xanthine oxydase est extrêmement toxique pour les microorganismes (bactéries, phages) et peut

inactiver une enzyme comme la ribonucléase pancréatique ; l'addition de superoxyde dismutase SODc nous a permis de réduire notablement de tels dommages. La superoxyde dismutase doit donc jouer un rôle important de protection de la cellule contre l'ion superoxyde produit au cours du métabolisme, et la présence de superoxyde dismutases distinctes dans différents sites de production cellulaires d' O_2^- comme le cytoplasme ou les mitochondries n'est pas surprenante.

BIBLIOGRAPHIE

1. — H. TAUBE : *Oxygen*, Little, Brown and Co, Boston, Mass. (1965).
2. — I. FRIDOVICH and P. HANDLER : *J. Biol. Chem.*, 233 (1958), pp. 1578-1580.
3. — E.C. FULLER and R.H. CRIST : *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941), pp. 1944-1945.
4. — I. FRIDOVICH and P. HANDLER : *J. Biol. Chem.*, 236 (1961), pp. 1836-1840.
5. — I.M. KOLTHOFF and J. JORDAN : *Anal. Chem.*, 24 (1952), pp. 1071-1076.
6. — B.L. HORECKER and L.A. HAPPEL : *J. Biol. Chem.*, 178 (1949), pp. 683-687.
7. — I. FRIDOVICH and P. HANDLER : *J. Biol. Chem.*, 237 (1962), pp. 916-921.
8. — M.M. WEBER, H.M. LENHOFF and N.O. KAPLAN : *J. Biol. Chem.*, 220 (1956), pp. 93-97.
9. — L. GREENLE, I. FRIDOVICH and P. HANDLER : *Biochem.*, 1 (1962), pp. 779-783.
10. — J.M. McCORD and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 243 (1968), pp. 5753-5760.
11. — J.M. McCORD and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 244 (1969), pp. 6049-6055.
12. — K.V. RAJAGOPALAN, I. FRIDOVICH AND P. HANDLER : *J. Biol. Chem.*, 237 (1962), pp. 922-928.
13. — G. ROTILIO, L. CALABRESE, A. FINAZZI AGRO and B. MONDOVI : *B.B.A.* 198 (1970), pp. 618-620.

14. — V. MASSEY, S. STICKLAND, S.G. MAYHEW, L.G. HOWELL, P.C. ENGEL, R.G. MATTHEWS, M. SCHUMAN and P.A. SULLIVAN : *B.B.R.C.* 36 (1969), pp. 891-897.
15. — D. BALLOU, G. PALMER and V. MASSEY : *B.B.R.C.* 36 (1969), pp. 898-904.
16. — A.M. MICHELSON : *Biochimie* 55 (1973), pp. 465-479.
17. — H.P. MISRA and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 246 (1971), pp. 6886-6890.
18. — H.P. MISRA and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 247 (1972), pp. 6960-6962.
19. — H.J. FORMAN and I. FRIDOVICH : *Science*, 175 (1972), pp. 339-340.
20. — M. ANBAR and I. PECHT : *J. Phys. Chem.*, 68 (1964), pp. 352-358.
21. — I. FRIDOVICH : *Accounts of Chemical Research*, 5 (1972), pp. 321-326.
22. — J.M. McCORD and I. FRIDOVICH : *Photochem. Photobiol.*, 17 (1973), pp. 115-121.
23. — J. WEISS : *Naturwissenschaften*, 23 (1935), pp. 64-69.
24. — J. WEISS : *Experientia*, 9 (1953), pp. 61-67.
25. — A.M. MICHELSON : *Biochimie*, 55 (1973), pp. 925-942.
26. — H.P. MISRA and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 247 (1972), pp. 3170-3173.
27. — C.O. BEAUCHAMP and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 245 (1970), pp. 4641-4646.
28. — F.O. BRADY, H.J. FORMAN and P. FEIGELSON : *J. Biol. chem.*, 246 (1971), pp. 7119-7124.
29. — J.P. HENRY, M.F. ISAMBERT and A.M. MICHELSON : *B.B.A.*, 205 (1970), pp. 437-450.
30. — J.P. HENRY and A.M. MICHELSON : *B.B.A.*, 205 (1970), pp. 451-458.
31. — J.P. HENRY et A.M. MICHELSON : *Biochimie*, 55 (1973), pp. 75-81.
32. — J.P. HENRY, M.F. ISAMBERT et A.M. MICHELSON : *Biochimie*, 55 pp. 83-93.
33. — A.M. MICHELSON et M.F. ISAMBERT : *Biochimie*, 55 (1973), pp. 519-534.
34. — B.B. KEELE Jr, J.M. McCORD and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 245 (1970), pp. 6176-6181.
35. — H.P. MISRA and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 247, pp. 3410-3414.
36. — C.O. BEAUCHAMP and I. FRIDOVICH : *B.B.A.*, 317 (1973), pp. 50-64.
37. — R.A. WEISIGER and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 248 (1973), pp. 3582-3591.
38. — Y. SAWADA, T. OHYAMA and I. YAMAZAKI : *B.B.A.* 268 (1972), pp. 305-312.
39. — S.A. GOSCIN and I. FRIDOVICH : *B.B.A.* 289 (1972), pp. 276-283.
40. — P.G. VANCE, B.B. KEELE Jr and K.V. RAJAGOPALAN : *J. Biol. Chem.*, 247 (1972), pp. 4782-4786.

41. — K. PUGET et A.M. MICHELSON : *Biochimie* (sous presse).
42. — L. HALBWACHS, (1974) : *Thèse de Doctorat de 3^e cycle (Biochimie)* ; Université de Paris VII.
43. — F.J. YOST Jr. and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.* 248 (1973), pp. 4905-4908.
44. — M.J. STANSELL and H.F. DEUTSCH : *J. Biol. Chem.*, 240 (1965), pp. 4299-4305.
45. — M.J. STANSELL and H.F. DEUTSCH : *J. Biol. Chem.*, 240 (1965), pp. 4306-4311.
46. — J.W. HARTZ and H.F. DEUTSCH : *J. Biol. Chem.*, 244 (1969), pp. 4565-4572.
47. — J. BANNISTER, W. BANNISTER and E. WOOD : *Eur. J. Biochem.*, 18 (1971), pp. 178-186.
48. — R.J. CARRICO and H.F. DEUTSCH : *J. Biol. Chem.*, 244 (1969), pp. 6087-6093.
49. — R.J. CARRICO and H.F. DEUTSCH : *J. Biol. Chem.*, 245 (1970), pp. 723-728.
50. — H.J. FORMAN and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 248 (1973), pp. 2645-2649.
51. — G. ROTILIO, A. FINAZZI AGRO, L. CALABRESE, F. BOSSA, P. GUERRIERI and B. MONDOVI : *Biochem.*, 10 (1971), pp. 616-621.
52. — H.J. FORMAN, H.J. EVANS, R.L. HILL and I. FRIDOVICH : *Biochem.*, 12 (1973), pp. 823-827.
53. — R.A. WEISIGER and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 248 (1973), pp. 4793-4796.
54. — G.H. CZAPSKI and H.J. BIELSKI : *J. Phys. Chem.*, 67 (1963), pp. 2180-2186.
55. — J. RABANI, W.A. MULAC and M.S. MATHESON : *J. Phys. chem.*, 69 (1965), pp. 53-58.
56. — H.J. BIELSKI and A.O. ALLEN : *J. Phys. Chem.*, 71 (1967), pp. 4544-4560.
57. — C.O. BEAUCHAMP and I. FRIDOVICH : *Anal. Biochem.*, 44 (1971), pp. 276-282.
58. — D. KLUG, J. RABANI and I. FRIDOVICH : *J. Biol. Chem.*, 247 (1972), pp. 4839-4842.
59. — G. ROTILIO, R.C. BRAY and E. MARTIN FIELDEN : *B.B.A.*, 268 (1972), pp. 605-609.
60. — J.V. BANNISTER, W.H. BANNISTER, R.C. BRAY, E. MARTIN FIELDEN, P.B. ROBERTS and G. ROTILIO : *F.E.B.S. Letters*, 32 (1973), pp. 303-306.
61. — G.H. CZAPSKI and L.M. DORFMAN : *J. Phys. Chem.*, 68 (1964), pp. 1169-1176.
62. — J. RABANI and S.O. NIELSEN : *J. Phys. Chem.*, 73 (1969), pp. 3736-3743.
63. — R. NILSSON, F.M. PICK, R.C. BRAY and E. MARTIN FIELDEN : *Acta Chem. Scand.*, 23 (1969), pp. 2554-2555.

64. — D. BEHAR, G. CZAPSKI, J. RABANI, L.M. DORFMAN and H.A. SCHWARTZ : *J. Phys. Chem.*, 74 (1970), pp. 3209-3218.
65. — P.S. RAO and E. HAYON : *B.B.R.C.*, 51 (1973), pp. 468-473.
66. — D. KLUG ROTH, I. FRIDOVICH and J. RABANI : *J.A.C.S.*, 95 (1973), pp. 2786-2790.
67. — H.J. FORMAN and I. FRIDOVICH : *Arch. Bio. Bio.*, 158 (1973), pp. 396-400.
68. — E.K. HODGSON and I. FRIDOVICH : *B.B.R.C.*, 54 (1973), pp. 270-274.
69. — J.M. McCORD, B.B. KEELE Jr. and I. FRIDOVICH : *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.*, 68 (1971), pp. 1024-1027.
70. — E.M. GREGORY and I. FRIDOVICH : *J. Bact.*, 114 (1973), pp. 543-548.
71. — J.L. WHITE, T.O. VAUGHN, W.S. YEH : *Abst. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Bio.*, 30 (1971), p. 1145.
72. — E.M. GREGORY and I. FRIDOVICH : *J. Bact.*, 114 (1973), pp. 1193-1197.
73. — E.M. GREGORY, F.J. YOST and I. FRIDOVICH : *J. Bact.*, 115 (1973), pp. 987-991.
74. — F. LAVELLE, P. DUROSAY et A.M. MICHELSON : *C.R. Acad. Sci. Paris*, 275 (1972), pp. 1227-1230.
75. — R.L. AIRTH, G.E. FOERSTER and P.Q. BEHRENS : *Bioluminescence in Progress*, (1966), (Eds F.H. JOHNSON and Y. HANEDA) Princeton Univ. Press, pp. 203-223.
76. — S. KUWABARA and E.C. WASSINK : *Bioluminescence in Progress* (1966), pp. 235-245.
77. — M.J. CORMIER and J.P. TOTTER : *Bioluminescence in Progress* (1966), pp. 227-231.
78. — H. BOISVERT, R. CHATELAIN et J.M. BASSOT : *Ann. Inst Pasteur*, 112 (1967), pp. 520-524.
79. — J.W. HASTINGS and G. WEBER : *J. Opt. Soc. Am.*, 53 (1963), pp. 1410-1415.
80. — B.J. DAVIS : *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121 (1964), pp. 404-427.
81. — R.G. MARTIN and B.N. AMES : *J. Biol. Chem.* 236 (1961), pp. 1372-1379.
82. — H.K. SCHACHMAN : *Ultracentrifugation in Biochemistry*, Academic Press, Inc. New York, (1969).
83. — N.R. WHITAKER : *Anal. Chem.*, 35 (1963), pp. 1950-1953.
84. — K. WEBER and M. OSBORN : *J. Biol. Chem.*, 244 (1969), pp. 4406-4412.
85. — Laboratoires L.K.B. (Suède) : *Notice technique sur l'électrofocalisation*.
86. — B.L. VALLÉE and W.E.C. WACKER : *The Proteins*, (1970), (NEURATH H. ed.), Acad. Press N.Y.
87. — M.C. SCRUTTON : *Biochem.*, 10 (1971), pp. 3897-3905.
88. — F.A. COTTON and D. WILKINSON : *Advanced Inorganic Chemistry* 2n ed. 1966, New York, N. Y. Interscience, p. 841.

89. — R. DINGLE : *Acta Chem. Scand.*, 20 (1966), pp. 33-44.
90. — M.C. SCRUTTON, M.F. UTTER and A.S. MILDVAN : *J. Biol. Chem.*, 244 (1966), pp. 3480-3487.
91. — C. NICOLAU, A.J. KALB and J. YARIV : *B.B.A.* 194 (1969), pp. 71-73.
92. — G.H. REED and M. COHN : *J. Biol. Chem.*, 245 (1970), pp. 662-663.
93. — M. EIGEN and G.G. HAMMES : *Advan. Enzymol.*, 25 (1963), pp. 1-38.
94. — B. CHANCE : *J. Biol. Chem.*, 194 (1952), pp. 471-481.
95. — J.R. LAGNADO and T.L. SOURKES : *Can J. Biochem. Physiol.*, 36 (1958), pp. 587-594.
96. — P.C. JOCELYN : *Biochem. J.*, 117 (1970), pp. 951-958.
97. — A.R. GREEN and G. CRUZOV : *Nature*, 220 (1968), pp. 1095-1097.
98. — F. LAVELLE, A.M. MICHELSON and L. DIMITRIJEVIC : *B.B.R.C.*, 55 (1973), pp. 350-357.
99. — K. PUGET and A.M. MICHELSON : *B.B.R.C.*, (1974), sous presse.
100. — E. MARTIN FIELDEN, P.B. ROBERTS, R.C. BRAY, D.J. LOWE, G.N. MAUTNER, G. ROTILIO and L. CALABRESE : *Biochem. J.*, 136 (1974), sous presse.

SIMPED - EVREUX.

